



ALK1 et BMP9 dans le remodelage vasculaire de la génétique humaine aux modèles murins

Nicolas Ricard

► To cite this version:

Nicolas Ricard. ALK1 et BMP9 dans le remodelage vasculaire de la génétique humaine aux modèles murins. Génétique. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV037 . tel-00854192

HAL Id: tel-00854192

<https://theses.hal.science/tel-00854192>

Submitted on 26 Aug 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Nicolas RICARD

Thèse dirigée par **Sabine BAILLY**

préparée au sein du **Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection**

dans l'**Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

ALK1 & BMP9 dans le remodelage vasculaire : *de la génétique humaine aux modèles murins*

Thèse soutenue publiquement le **23 septembre 2011**,
devant le jury composé de :

Madame Sabine BAILLY

Directrice de recherche au CEA de Grenoble, Directeur

Madame An ZWIJSEN

Professeur à l'Université catholique de Louvain, Rapporteur

Monsieur Marc HUMBERT

Professeur à l'Université Paris-Sud, Rapporteur

Madame Corinne ALBIGES-RIZO

Directrice de recherche à l'Institut Albert Bonniot, Examineur

Monsieur Philippe BERTOLINO

Chargé de recherche au Centre Lyon-Bérard, Examineur



Remerciements

Je remercie grandement le Professeur An Zwijsen, le Professeur Marc Humbert, le Docteur Corinne Albigès-Rizo et le Docteur Philippe Bertolino de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie aussi vivement ma directrice de thèse, le Docteur Sabine Bailly, pour m'avoir guidé tout au long de ces quatre années de thèse. Ta rigueur scientifique m'a permis de mener à bien plusieurs projets scientifiques. Merci aussi de m'avoir donné la possibilité de développer mes connaissances et mes compétences en m'autorisant à suivre de multiples formations et en me permettant d'assister et de présenter à de multiples congrès scientifiques.

Un grand merci au Docteur Jean-Jacques Feige qui m'a accueilli dans son laboratoire. Ta disponibilité et tes conseils (scientifiques et pour mon avenir professionnel) avisés ont grandement contribué au succès de ma thèse.

Merci également à l'ensemble de l'équipe "TAL" (Christine, Daniel, Galia, Emma, Mariela, Sandrine, Marie, Delphine) pour la bonne ambiance que vous faites régner, vos conseils et les différents coups de main que vous avez pu m'apporter. Un merci tout particulier à Christine qui m'a appris la plupart des techniques que je maîtrise aujourd'hui. Merci aussi à Sandrine pour m'avoir fait découvrir l'escalade et le skating !

Je remercie l'ensemble des personnes du laboratoire BCI pour leur aide qui permet de travailler sereinement. Merci particulièrement aux personnes de l'ex U878 et aux "Cochet" pour leur soutien depuis quatre ans, ainsi qu'à nos trois secrétaires (Sonia, Christine et Nicole) qui font trembler les formalités administratives les plus coriaces. Merci aussi à Ina, Michel et Danièle pour leurs conseils sur la production de protéines et à Stéphanie pour sa démonstration de dissection de l'œil de souris.

Un autre grand merci pour tout le personnel technique et des plateformes (Christine à la laverie ; Véronique au FACS ; Isa, Nico, Irène et Hervé à l'animalerie ; Didier au confocal). Votre implication a été indispensable pour mes travaux.

Un immense merci à Grande Sophie qui m'a supporté (dans presque tous les sens du terme) quotidiennement dans notre petit bureau. Notre "petit couple" qui prenait son café, thé ou chocolat devant le petit journal va bientôt se séparer. J'espère ne pas avoir trop altéré ta santé mentale avec mon "certain sens de l'humour". D'un côté tu es rodée contre tout chef sarcastique.

Un merci à l'équipe de l'ekiden : Grande Sophie (avec ses problèmes de frange), Aude (toute rouge), Sandrine (sans ses mousquetons mais toujours avec son esprit de pure compétitrice) et Odile (le moteur de l'équipe). Même sous la pluie nous avons tenu jusqu'au bout. Et j'ai enfin eu ma revanche sur le ski ! Vive le footing !

Un merci tout particulier à ma famille, mes parents, ma sœur et ma grand-mère Yvette pour leur soutien indéfectible pendant mes neuf ans d'étude. Sans eux, rien n'aurait été possible.

Un autre merci à mes amis : Chipou, Benoît, Carole, Lisa, Guigui, Claire, Boris, Piflet, Ceds, Soφ, Alex, Mimi, Difine, Julie, et al. (désolé pour ceux que j'oublie). Désolé pour ceux qui ont skié avec moi, mais j'ai fait de mon mieux !

Enfin, un immense merci à Emeraude, ma petite minette qui a vécu ces quatre années à mes côtés. Même si les ronrons à 5 h du mat' c'est un peu difficile, je t'adore !

Sommaire

Sommaire	1
Table des figures et des tableaux.....	6
Introduction	9
Partie 1 : L'angiogenèse.....	9
1. La vasculogenèse.....	9
2. L'angiogenèse	10
2.1 Les deux mécanismes d'angiogenèse : intussusception et bourgeonnement....	10
2.2 L'angiogenèse par bourgeonnement : un processus en deux phases.	11
2.2.1 La phase d'activation	11
2.2.2 La phase de maturation	13
2.2.3 L'endothélium mature.....	13
2.3 Les principaux facteurs de l'angiogenèse.	15
2.3.1 La famille du VEGF : protéine clé de la phase d'activation.....	15
2.3.2 La voie Notch : régulateur majeur du bourgeonnement.....	16
2.3.3 Les angiopoïétines : rôle biphasique de cette famille	17
2.3.4 Les PDGFs : acteurs du recouvrement des vaisseaux	17
2.3.5 Famille TGF- β et BMPs : acteurs de la maturation des vaisseaux.....	18
2.4 Les principaux facteurs angiostatiques endogènes.....	18
2.5 Les pathologies impliquant l'angiogenèse et les traitements possibles	19
2.5.1 L'angiogenèse tumorale.....	19
2.5.2 Les thérapies de l'angiogenèse	20
2.6 Les modèles d'étude de l'angiogenèse	22
2.6.1 Modèles d'angiogenèse in vitro	22
2.6.2 Modèle d'angiogenèse ex vivo	23
2.6.3 Modèles d'angiogenèse in vivo	24
Partie 2 : La signalisation de la famille TGF- β	28
1. La famille TGF- β : une famille nombreuse.....	28
1.1 Les ligands de la famille TGF- β	28
1.1.1 Bref historique.....	28
1.1.2 Les membres de la superfamille du TGF- β	30
1.1.3 Synthèse des ligands.....	32

1.2	Les récepteurs de la famille TGF- β	35
1.2.1	Bref historique.....	35
1.2.2	Structures des récepteurs.....	36
	Les récepteurs de type 1 et de type 2	36
	Les récepteurs de type 3	37
2.	Activation des voies de la famille TGF- β	38
2.1	Liaison du ligand sur les récepteurs	38
2.1.1	Etat basal des récepteurs	38
2.1.2	Liaison du ligand sur les récepteurs	39
2.1.3	Etat activé des récepteurs	43
2.2	Intégration du signal par endocytose des récepteurs.....	44
2.3	Les voies de signalisation.....	45
2.3.1	La voie de signalisation Smad.....	45
	Structure des Smads	46
	Etat basal des R-Smads et de Smad4	47
	Activation des R-Smads par phosphorylation et oligomérisation.....	49
	Effet transcriptionnel des Smads.....	51
	Terminaison de la signalisation Smad.....	52
	Régulateurs de la voie Smad	54
2.3.2	Les voies de signalisation Smad-indépendantes	55
	Les voies des MAP kinases.....	55
	Les petites protéines G de type Rho.....	57
	La voie PI3K/Akt	57
2.3.3	Déterminisme des voies de signalisation	58
2.4	Les régulateurs de l'activation des récepteurs	59
2.4.1	Les régulations liant des ligands	59
	La noggine.....	60
	La famille de la chordine.....	60
	La Tsg.....	61
	La famille Dan.....	61
	La famille de la follistatine.....	61
2.4.2	Les compétiteurs de liaison sur les récepteurs	62
2.4.3	Les régulateurs liés à la membrane plasmique.....	62
2.4.4	Les régulateurs transmembranaires	62

2.4.5	Les régulateurs cytoplasmiques	63
2.4.6	Les régulateurs nucléaires	63
2.4.7	Les récepteurs solubles.....	64
Partie 3 : La famille TGF- β dans le système cardiovasculaire.....		65
1.	Les maladies vasculaires impliquant des membres de la famille TGF- β	65
1.1	Implication de la famille TGF- β dans la maladie de Rendu-Osler	65
1.2	Implication de la famille TGF- β dans l'hypertension artérielle pulmonaire familiale.....	66
1.3	Implication de la famille TGF- β dans le syndrome de Loeys-Dietz	66
2.	Invalidation de gènes de la famille du TGF- β et phénotypes cardiovasculaires.....	67
2.1	Famille TGF- β et formation cardiaque.....	67
2.1.1	Invalidation de ligand et formation cardiaque.....	67
2.1.2	Invalidation de récepteur et formation cardiaque.....	68
2.1.3	Invalidation de la voie Smad et formation cardiaque.....	69
2.2	Famille TGF- β et développement du système vasculaire	69
2.2.1	Invalidation de ligand et angiogenèse	69
2.2.2	Invalidation de récepteur et angiogenèse	70
2.2.3	Invalidation de la voie Smad et angiogenèse	73
2.2.4	Invalidation de TAK1 et angiogenèse	74
2.2.5	Invalidation d'Id1 et d'Id3 et angiogenèse	74
3.	ALK1, Endogline et BMP9/BMP10 : un trio sanguin !.....	75
3.1	Le récepteur ALK1	75
3.1.1	Historique et site d'expression d'ALK1	75
3.1.2	Complexe de signalisation d'ALK1	76
3.1.3	Effets cellulaires d'ALK1	79
3.1.4	Régulateurs de l'expression d'ALK1	80
3.2	L'endogline, co-récepteur impliqué dans la signalisation ALK1	82
3.2.1	Historique et sites d'expression de l'endogline.....	82
3.2.2	Complexe de signalisation de l'endogline	83
3.2.3	Effets cellulaires de l'endogline.....	84
3.3	BMP9 et BMP10, ligands physiologiques d'ALK1	85
3.3.1	Historique et structure de BMP9	85
3.3.2	Effets de BMP9 sur les cellules endothéliales	86
3.3.3	Cibles transcriptionnelles d'ALK1/BMP9.....	87

3.3.4	Autres effets de BMP9	88
3.3.5	Effets de BMP9 sur les cellules tumorales.....	89
3.3.6	BMP10 : un ligand physiologique d'ALK1 peu connu	90
4.	La voie ALK1 et le cancer	91
5.	Implication d'autres membres dans l'angiogenèse.....	92
Partie 4 : Deux maladies vasculaires de la voie TGF- β : la maladie de Rendu-Osler et l'hypertension artérielle pulmonaire		93
1.	La maladie de Rendu-Osler.....	93
1.1	Symptômes et diagnostic clinique.....	93
1.2	Génétique de la maladie de Rendu-Osler	94
1.3	Modèles animaux d'étude de la maladie de Rendu-Osler	96
1.4	Etudes fonctionnelles de mutations impliquées dans la maladie de Rendu-Osler.....	98
1.4.1	Etudes des mutations de ENG pour HHT-1	98
1.4.2	Etudes des mutations d'ACVRL1 pour HHT-2.....	100
1.5	Modèles moléculaires et cellulaires de HHT	101
1.6	Les traitements de la maladie de Rendu-Osler.....	104
2.	L'hypertension artérielle pulmonaire.....	105
2.1	Les différentes formes de la maladie.....	106
2.2	Génétique de l'HTAP	106
2.3	Modèles animaux d'étude de l'HTAP	108
2.4	Etudes fonctionnelles de mutations impliquées dans l'HTAP.....	109
2.5	Modèle moléculaire et cellulaire de l'HTAP	112
2.6	Les traitements de l'HTAP	114
Objectifs		115
Résultats		116
Projet 1 : BMP9 : outil diagnostique dans la maladie de Rendu-Osler.....		116
Contexte de l'étude		116
Objectifs de l'étude		117
Méthodologie		117
Résultats		118
Discussion		119
Conclusion et perspectives		122
Projet 2 : Structure du complexe ALK1/BMP9.		123

Introduction	123
Méthodes et résultats	124
Conclusion.....	126
Projet 3 : Analyse de l'angiogenèse des souris BMP9 -/-.....	127
Contexte de l'étude	127
Objectifs de l'étude	127
Méthodologie	127
Résultats	128
Discussion	129
Conclusion.....	132
Perspectives	134
Liste des abréviations	139
Références bibliographiques	142

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Les étapes de la vasculogenèse.....	9
Figure 2 : Les deux types d'angiogenèse	10
Figure 3 : L'angiogenèse par intussusception.....	10
Figure 4 : Base moléculaire de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	11
Figure 5 : Morphologies des vaisseaux.....	13
Figure 7 : Perméabilité de l'endothélium.....	14
Figure 8 : Signalisation de la famille du VEGF	15
Figure 9 : Contrôle du bourgeonnement par la voie Notch.....	16
Figure 10 : Signalisation d'Ang1 et Ang2 sur Tie2	17
Figure 11 : Signalisation de PDGF-BB.....	17
Figure 12 : Contraste entre la microvascularisation normale et tumorale.....	19
Figure 13 : Différentes stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ciblant la signalisation du VEGF	20
Figure 14 : Représentation schématique de l'évolution de la vascularisation tumorale lors d'une thérapie anti-angiogénique	21
Figure 15 : Modèles d'angiogenèse <i>in vitro</i>	22
Figure 16 : Modèle d'angiogenèse <i>ex vivo</i> : bourgeonnement d'un anneau d'artère ombilicale humaine	23
Figure 17 : Modèles d'angiogenèse <i>in vivo</i> – 1 ^{ère} partie	24
Figure 18 : Modèles d'angiogenèse <i>in vivo</i> – 2 ^{ème} partie	25
Figure 19 : Modèles d'angiogenèse <i>in vivo</i> – 3 ^{ème} partie	26
Figure 20 : Découverte du TGF- β	28
Figure 21 : Modèle expérimental pour tester l'effet de TGF- β sur la cicatrisation	29
Figure 22 : Structures des membres de la famille TGF- β	30
Figure 23 : Arbre phylogénétique déraciné des 37 membres de la famille TGF- β chez l'homme.....	31
Figure 24 : Architecture du proTGF- β 1	32
Figure 25 : Représentation schématique de la structure de proTGF- β 1 et du mécanisme d'activation.....	34
Figure 26 : Arbre phylogénétique des récepteurs de la famille TGF- β chez l'homme	35
Figure 27 : Structure cristallographique du domaine kinase d'ALK5	36
Figure 28 : Structure du bétaglycan et de l'endogline	37

Figure 29 : Modes de formation des complexes de récepteurs.....	39
Figure 30 : Modes de liaison des ligands de la famille TGF-β	41
Figure 31 : Modes de liaison des récepteurs de type 2.....	42
Figure 32 : Extension préhélice caractéristique d'ALK5	43
Figure 33 : Comparaison des structures cristallographiques d'ALK5 inactif et actif.....	43
Figure 34 : Schématisation simplifiée des modes d'endocytose des récepteurs des BMPs.....	45
Figure 35 : Arbre phylogénétique des Smads de la famille TGF-β chez l'homme	45
Figure 36 : Structure des R-Smads.....	46
Figure 37 : Transports des Smads Noyau/Cytoplasme.....	47
Figure 38 : Schématisation des deux voies Smads.....	49
Figure 39 : Structure cristallographique de complexes trimériques de Smads.....	50
Figure 40 : Interférences entre la voie Smad et d'autres voies de signalisation	52
Figure 41 : Modes d'action des I-Smads	53
Figure 42 : Sites de phosphorylation des Smads	54
Figure 43 : Activation des voies Smad-indépendantes par TGF-β – 1^{ère} partie	56
Figure 44 : Activation des voies Smad-indépendantes par TGF-β – 2^{ème} partie	57
Figure 45 : Déterminisme des voies de signalisation.....	58
Figure 46 : Structure cristallographique du complexe BMP7/Noggin.....	60
Figure 47 : Structure cristallographique du complexe Activine/Follistatine.....	61
Figure 48 : Structure cristallographique du complexe ALK5/FKBP12.....	63
Figure 49 : Développement embryonnaire du cœur de souris	67
Figure 50 : Phénotype de l'inactivation d'ALK1.....	70
Figure 51 : Site d'expression d'ALK1 et d'ALK5 dans les vaisseaux.....	72
Figure 52 : Phénotype de l'inactivation de l'endogline.....	73
Figure 53 : Phénotype vasculaire de l'inactivation de gènes impliqués dans la signalisation de la famille TGF-β	74
Figure 54 : Modèle de signalisation d'ALK1 avec TGF-β comme ligand	77
Figure 55 : Modèle de signalisation d'ALK1 avec BMP9/BMP10 comme ligand.....	78
Figure 56 : Différents complexes de signalisation de l'endogline.....	83
Figure 57 : Effet différentiel des deux isoformes de l'endogline sur la signalisation ALK1/ALK5	84
Figure 58 : Structure cristallographique du dimère mature de BMP9.....	85
Figure 59 : Symptômes de la maladie de Rendu-Osler.....	94

Figure 60 : Répartition des mutations HHT sur les gènes codant pour l'endogline (A) et ALK1 (B)	95
Figure 61 : Modèles animaux pour HHT	96
Figure 62 : Formation de fistules artério-veineuses dans des souris invalidées pour ALK1	97
Figure 63 : Modèles moléculaires et cellulaires de HHT	102
Figure 64 : Modèles moléculaires et cellulaires de HHT, suite	103
Figure 65 : Lésions vasculaires de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	106
Figure 66 : Modèles animaux pour HTAP.....	108
Figure 67 : Modèle moléculaire et cellulaire de HTAP.....	112
Figure 68 : Remodelage vasculaire dans l'HTAP.....	114
Figure 69 : Comparaison des séquences C-terminale des différents récepteurs de type 1.....	119
Figure 70 : Transactivation et transcomplémentation d'ALK5.....	120
Figure 71 : Les mutants NANDOR ne sont pas transcomplémentés par des mutants kinases	121
Figure 72 : Projection plane de la disposition des récepteurs de TGF-β3 et BMP2	122
Figure 73 : Production d'ALK1ecd	124
Figure 74 : Production de BMP9	126
Figure 75 : Augmentation de la densité vasculaire de la rétine des souris hétérozygotes pour Dll4.....	129
 Tableau 1 : Invalidation des gènes de la famille TGF-β et conséquence sur le développement cardiaque	 68
Tableau 2 : Invalidation des gènes de la famille TGF-β et conséquence sur le développement vasculaire	69

Introduction

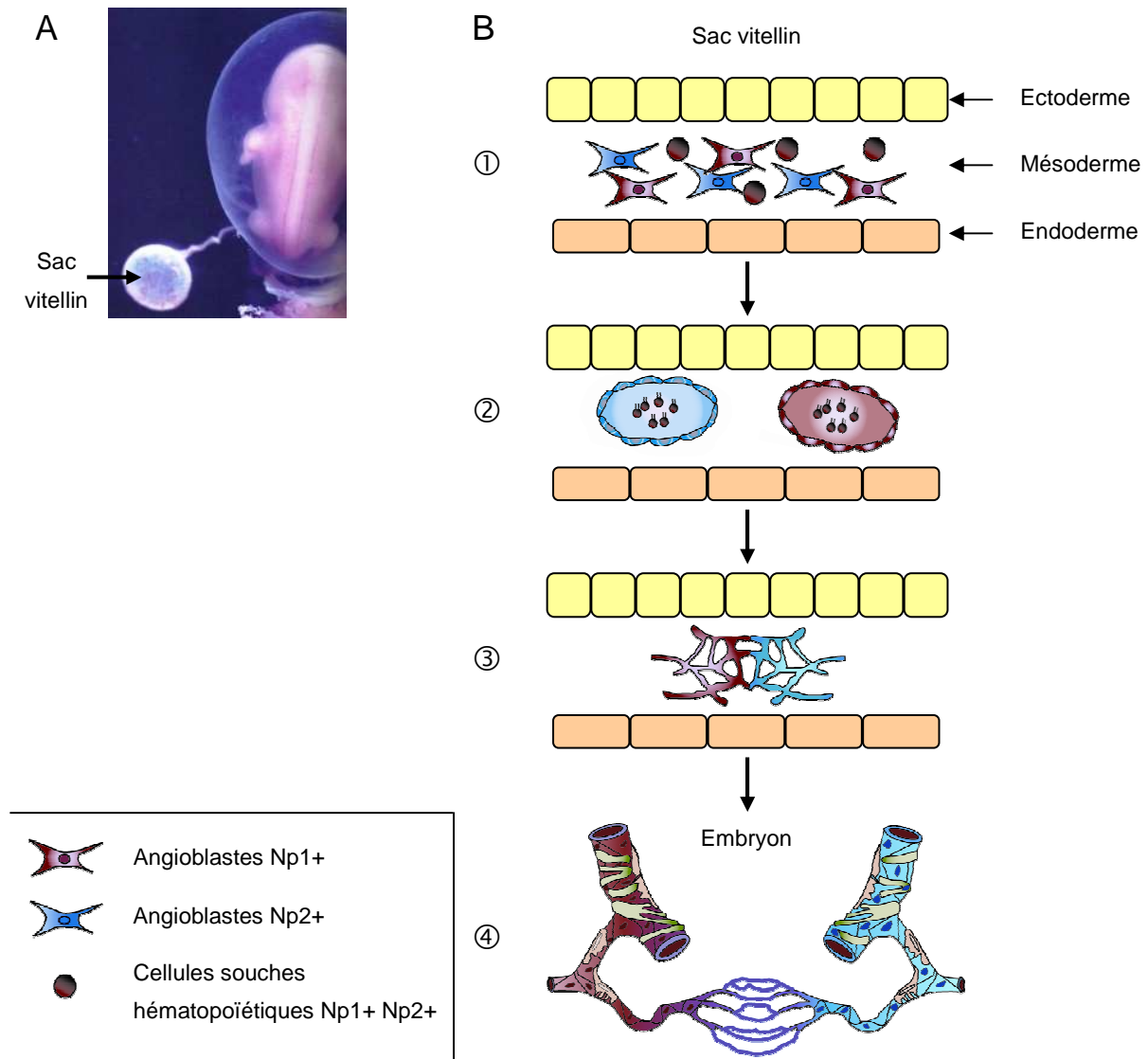


Figure 1 : Les étapes de la vasculogenèse.

A : Photographie d'un embryon humain à six semaines de grossesse. Le sac vitellin est une annexe embryonnaire. D'après <http://www.epigee.org/fetal1.html>

B : Les différentes étapes de la vasculogenèse. ① Les progéniteurs vasculaires migrent du pli primitif postérieur (dans l'embryon) vers le mésoderme du sac vitellin. Ces progéniteurs sont VEGFR2 positifs et expriment neuropiline 1 (Np1 +), et/ou 2 (Np 2+) en fonction de leur devenir. ② Dans le mésoderme du sac vitellin, les progéniteurs forment des îlots sanguins. Les cellules périphériques de ces îlots se différencient en cellules endothéliales veineuses (Np1+) ou artérielles (Np2+) et entourent les cellules hématopoïétiques. ③ Les îlots sanguins fusionnent et forment le plexus vasculaire primitif : c'est la vasculogenèse. ④ Les cellules endothéliales du plexus vasculaire primitif migrent du mésoderme du sac vitellin vers l'embryon pour former le réseau vasculaire mature : c'est l'angiogenèse. D'après (Coultas L. 2005).

Introduction

Ma thèse porte sur l'étude du récepteur de la famille du TGF- β spécifique des cellules endothéliales, ALK1, et sur son ligand, BMP9, dans l'angiogenèse. Je vais donc dans cette introduction exposer les données bibliographiques sur l'angiogenèse, la famille TGF- β et l'implication de cette famille dans le système vasculaire et des maladies vasculaires.

Partie 1 : L'angiogenèse

Les vaisseaux sanguins assurent l'approvisionnement des cellules des organismes vivants complexes en nutriments et en oxygène. La formation du réseau vasculaire se produit au stade embryonnaire précoce et se passe en deux étapes distinctes : la vasculogenèse et l'angiogenèse. Mon introduction se focalisera principalement sur l'angiogenèse.

1. La vasculogenèse

La première structure vasculaire dans l'embryon est formée à partir de cellules du mésoderme (figure 1). Des cellules du mésoderme migrent vers le sac vitellin et se différencient en hémangioblastes. Elles forment alors des amas appelés îlots sanguins. Les cellules périphériques de ces îlots, appelées angioblastes, se différencient alors en cellules endothéliales, tandis que les cellules du centre des îlots sont à l'origine des cellules hématopoïétiques. Les îlots sanguins fusionnent alors formant ainsi le plexus vasculaire primitif. Ce processus, qui conduit à la formation de premières structures vasculaires, s'appelle la vasculogenèse (Risau W. 1995). Plusieurs facteurs guident la vasculogenèse, dont le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) et le Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) (Pardanaud L. 1999).

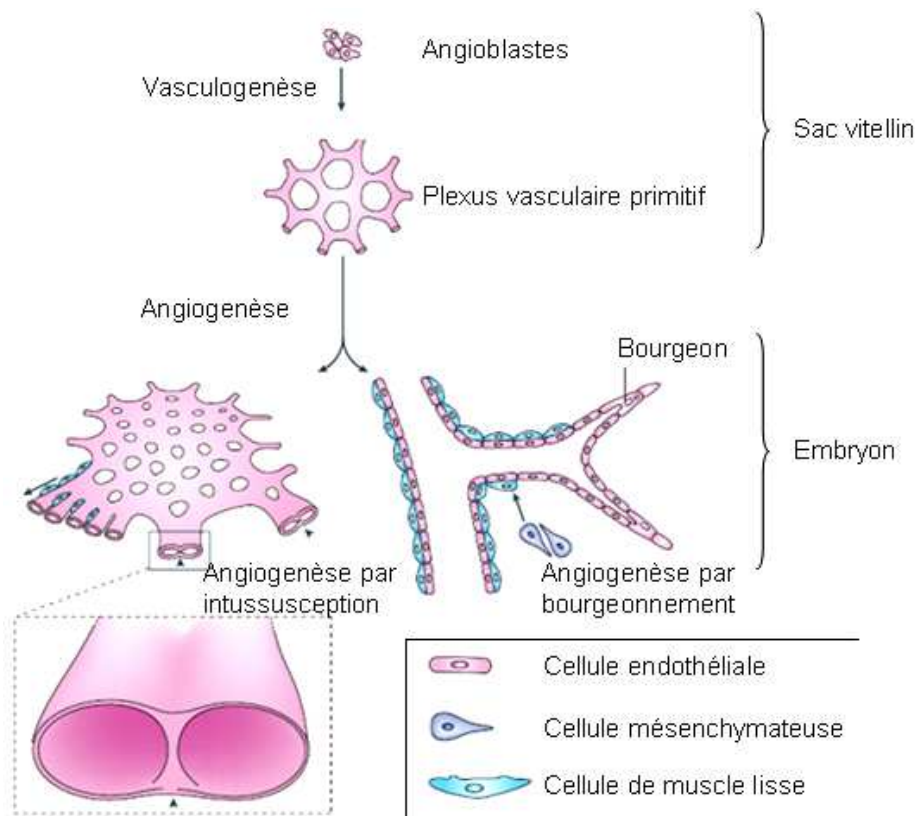


Figure 2 : Les deux types d'angiogenèse.

A la suite de la vasculogenèse, le réseau sanguin s'établit dans l'embryon. Les vaisseaux se forment par deux types d'angiogenèse : l'angiogenèse par intussusception et l'angiogenèse par bourgeonnement. Les cellules endothéliales sont recouvertes par des cellules de muscle lisse dérivant de cellules mésenchymateuses, ce qui forme un vaisseau mature. D'après (ten Dijke P. 2007).

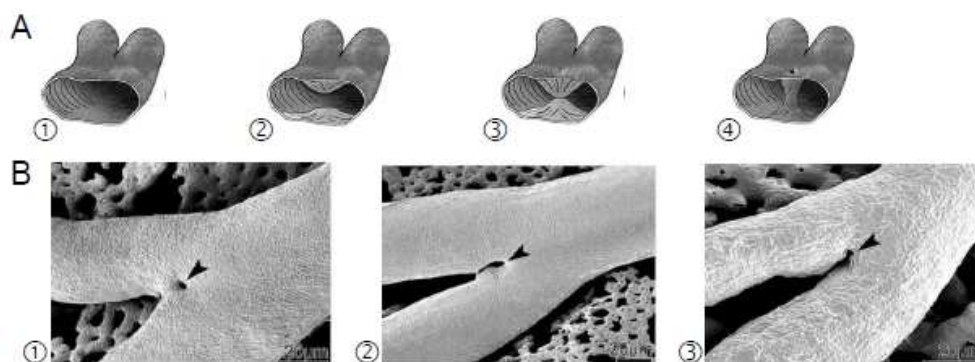


Figure 3 : L'angiogenèse par intussusception.

A : Représentation schématisée de l'angiogenèse par intussusception. ① Vaisseaux initiaux. ② Invaginations opposées de la paroi vasculaire dans la lumière du vaisseau. ③ Contact et fusion entre les deux invaginations. ④ La bicouche endothéliale est perforée et un pilier transluminal est formé. D'après (Makanya A. N. 2009).

B : Remodelage vasculaire par intussusception sur la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet. ① Formation d'un petit pilier (flèche). ② Extension du pilier jusqu'à l'intersection voisine. ③ Il en résulte une remontée de cette intersection et une diminution de l'angle de branchement. D'après (Makanya A. N. 2009).

2. L'angiogenèse

Après la formation du plexus vasculaire primitif, de nouvelles cellules endothéliales sont formées, générant des nouveaux capillaires par bourgeonnement ou par intussusception. L'angiogenèse est le processus de formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins à partir du plexus vasculaire primitif ou de vaisseaux préexistants (figure 2). L'étude moderne de l'angiogenèse a été initiée par Folkman en 1971, lorsque ce dernier émis l'idée d'une angiogenèse active nécessaire à la croissance tumorale (Folkman J. 1971). Je vais présenter dans cette partie les deux types d'angiogenèse, les phases de l'angiogenèse, les principaux facteurs régulant ce processus, ainsi que les modèles d'étude.

2.1 Les deux mécanismes d'angiogenèse : intussusception et bourgeonnement.

L'angiogenèse par intussusception consiste en la division longitudinale d'un vaisseau sanguin en deux vaisseaux (figure 3). Ce mécanisme se produit donc sur des vaisseaux sanguins préexistants formés lors de l'angiogenèse par bourgeonnement. Elle est très importante dans le remodelage vasculaire pulmonaire (qui se produit dans les deux ans après la naissance chez l'homme), ainsi que dans la vascularisation du muscle pour l'adaptation à l'effort. L'angiogenèse par intussusception est aussi présente dans la vascularisation tumorale, bien que moins prépondérante que l'angiogenèse par bourgeonnement (Makanya A. N. 2009).

L'angiogenèse par bourgeonnement se caractérise par une activation des cellules endothéliales qui prolifèrent et migrent, formant ainsi des nouveaux capillaires qui vont s'anastomoser, aboutissant à un réseau vasculaire. Je vais par la suite décrire uniquement l'angiogenèse par bourgeonnement, que je désignerai par simplification par le terme angiogenèse.

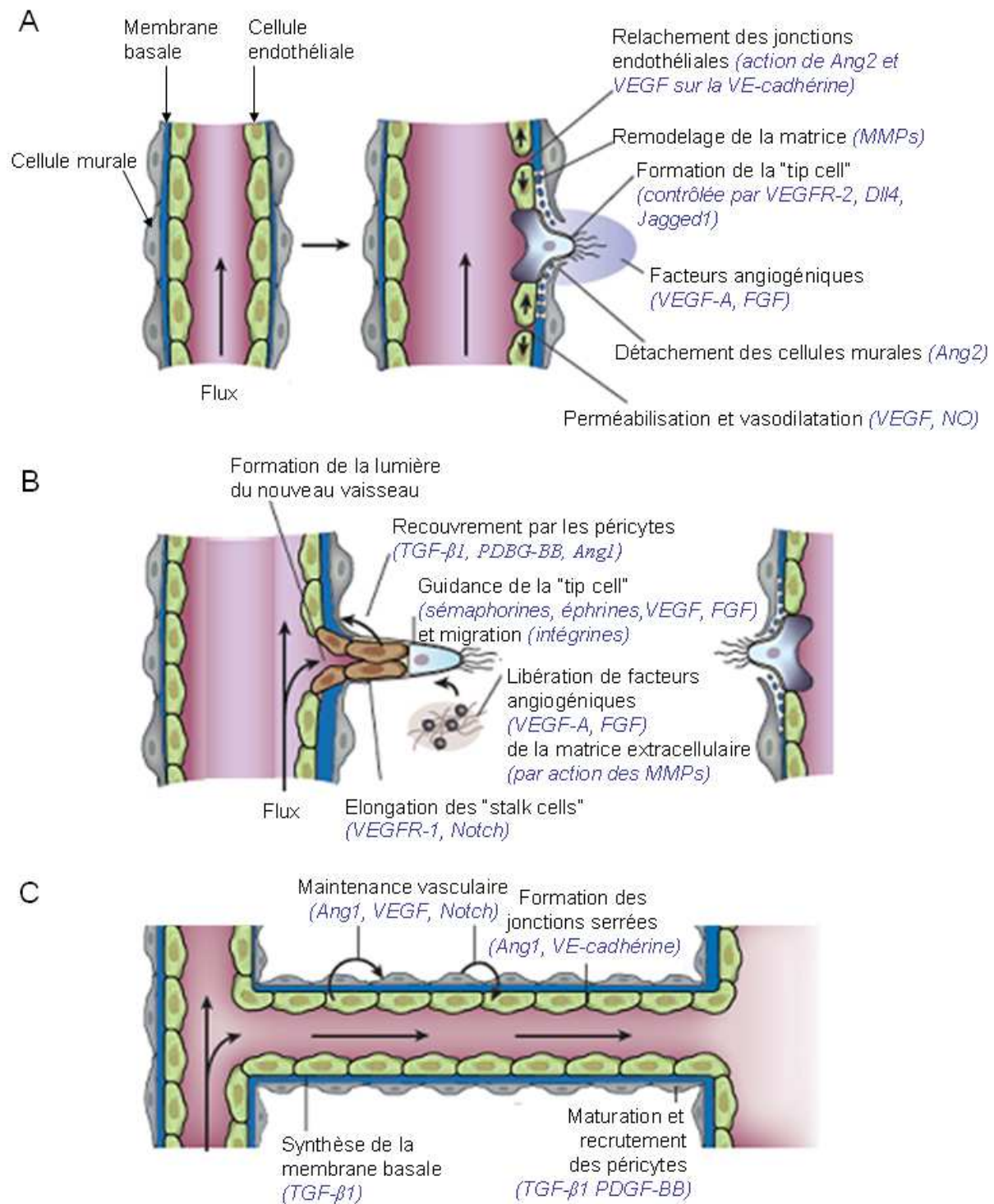


Figure 4 : Base moléculaire de l'angiogenèse par bourgeonnement.

A : Sélection de la "tip cell".

B : Migration de la "tip cell" et prolifération des "stalk cells".

C : Quiescence des "phalanx cells".

Principaux facteurs pour chaque étape.

D'après (Carmeliet P. 2011).

2.2 L'angiogenèse par bourgeonnement : un processus en deux phases.

L'angiogenèse se décompose en deux phases distinctes : la phase d'activation et la phase de maturation.

2.2.1 *La phase d'activation*

Elle consiste en une vasodilatation, en la dégradation de la membrane basale supportant les cellules endothéliales, au retrait des cellules de muscle lisse (artères/veines) ou des péricytes (capillaires), et en la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

La première étape est une vasodilatation des vaisseaux. Cette vasodilatation est due au monoxyde d'azote (NO) sécrété par les cellules endothéliales sous l'effet du VEGF (van der Zee R. 1997). Cette vasodilatation induit une augmentation de la perméabilité vasculaire par remodelage des liaisons inter-cellules endothéliales (figure 4A) (Eliceiri B. P. 1999) (Carmeliet P. 2000).

La poursuite de perméabilisation de l'endothélium se produit par décrochage des cellules murales (cellules de muscle lisse et péricytes) et relâchement des liaisons inter-cellules endothéliales à l'état basal (figure 4A). L'Angiopoïétine 1 (Ang1) se lie sur le récepteur endothélial Tie2 et induit le resserrement des liaisons entre cellules endothéliales dans l'endothélium quiescent (Thurston G. 2000). L'Angiopoïétine 2 (Ang2), sécrétée en réponse à des facteurs comme le VEGF ou suite à une hypoxie (Oh H. 1999), permet le relâchement des liaisons entre les cellules endothéliales et les cellules murales par son action antagoniste sur Tie2 (Maisonpierre P. C. 1997).

Enfin, la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par des enzymes, par exemple les métalloprotéases (MMPs) ou les activateurs du plasminogène de type urokinase, permet la migration et la prolifération des cellules endothéliales (figure 4B) (van Hinsbergh V. W. 2008). Cette dégradation de la MEC permet aussi la libération de facteurs de croissance jusqu'alors séquestrés sous une forme inactive dans la MEC, comme certaines isoformes du VEGF-A (figure 4B) (van Hinsbergh V. W. 2006).

Les cellules endothéliales peuvent alors proliférer et migrer. La migration des cellules endothéliales se fait grâce à l'interaction des intégrines (notamment l' $\alpha_v\beta_3$), protéines

transmembranaires reliant le cytosquelette à la MEC (figure 4B) (Brooks P. C. 1994a). Le VEGF ainsi que le FGF induisent l'expression des intégrines, normalement peu exprimées dans l'endothélium quiescent (Eliceiri B. P. 1998) (Brooks P. C. 1994b). La migration des cellules endothéliales se fait en remontant le gradient des facteurs proangiogéniques (par exemple : VEGF, FGF) et fait apparaître deux phénotypes de cellules endothéliales différents : les cellules de tête ou "tip cells" et les cellules de tige ou "stalk cells" (figure 4B) (Ruhrberg C. 2002) (Gerhardt H. 2003). Lors d'un bourgeonnement, une "tip cell" guide les cellules endothéliales "stalk cells" qui prolifèrent et forment ainsi le corps du bourgeon. Le contrôle du nombre de "tip cell" (une seule par bourgeonnement) est assuré par la voie Dll4/Notch1. En effet, VEGF-A induit Dll4 (Delta Like Ligand) dans une cellule endothéliale du vaisseau initialement quiescent via le récepteur VEGFR2 (Liu Z. J. 2003). Cette cellule prend alors le phénotype tip cell et la voie Dll4/Notch1 activée dans les cellules adjacentes pousse ces cellules voisines à prendre le phénotype "stalk cell" (Hellstrom M. 2007). L'activation de la voie Notch1 dans les "stalk cells" réprime l'expression de VEGFR2 et induit l'expression du récepteur VEGFR1, un récepteur de séquestration du VEGF (Harrington L. S. 2008) (Suchting S. 2007) (Williams C. K. 2006). Une récente étude de l'équipe de H. Gerhardt a montré que la détermination du phénotype "tip cell"/"stalk cell" n'est pas figé mais dynamique lors de la croissance du bourgeon (Jakobsson L. 2010). Récemment, un troisième état des cellules endothéliales a été décrit : les "phalanx cells" ou cellules phalanges, par analogie à la formation militaire de la Grèce antique appelée phalange et décrivant une colonne de lanciers fortement armés (figure 4C) (Mazzone M. 2009). Les cellules phalanges, localisées derrière les "stalk cells", forment un endothélium serré, quiescent, qui perfuse parfaitement les tissus. Enfin, plusieurs études montrent une implication des facteurs de guidance neuronaux (dont les sémaphorines et les éphrines) dans l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales (Carmeliet P. 2005). La migration des cellules endothéliales cesse lorsque le bourgeon s'anastomose avec un vaisseau existant. Les macrophages jouent un rôle important dans cette anastomose (Fantin A. 2010).

Le nouveau vaisseau ainsi formé est fragile et nécessite une maturation pour devenir pleinement fonctionnel. C'est la seconde phase de l'angiogenèse.

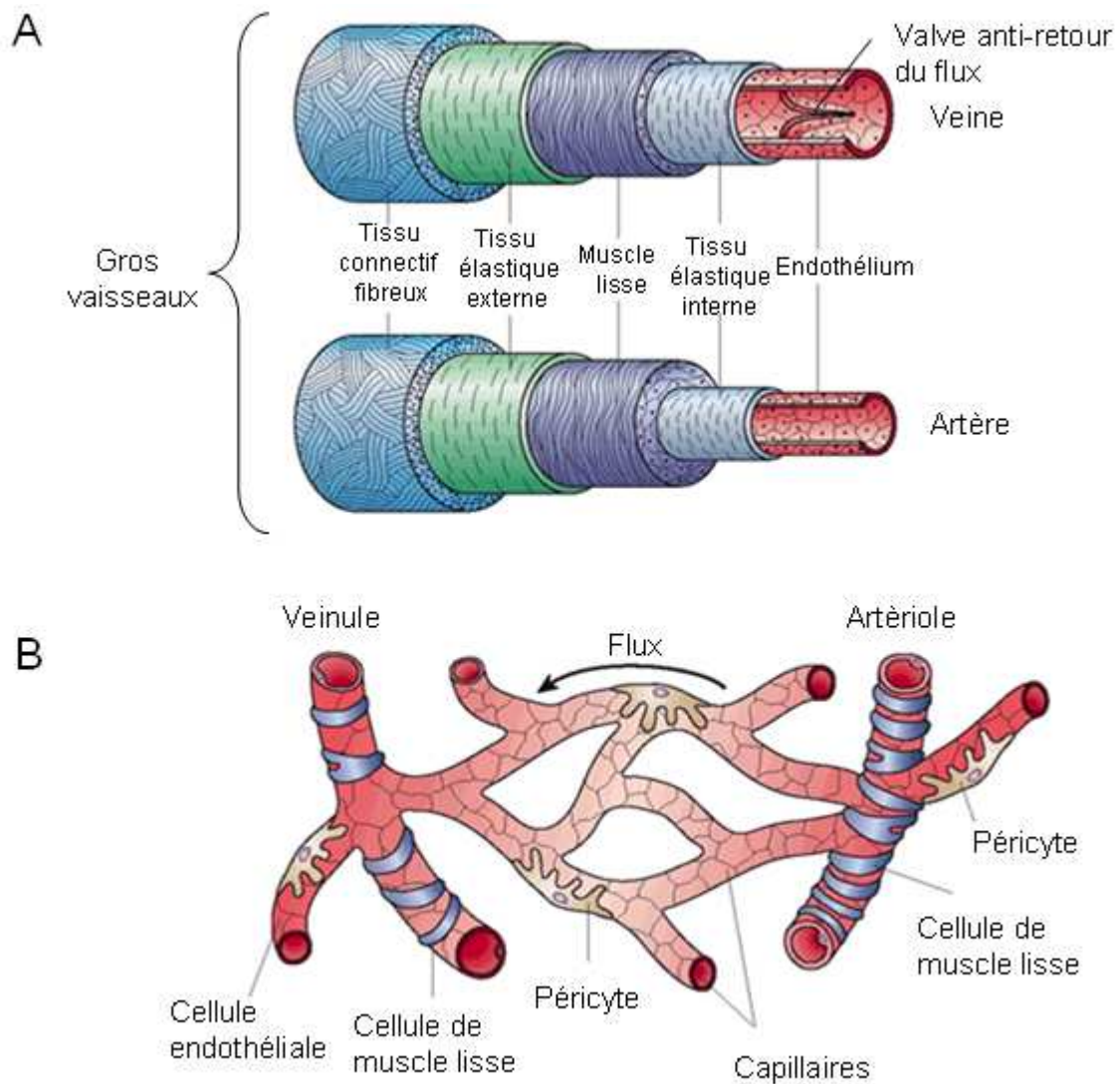


Figure 5 : Morphologies des vaisseaux.

A : Composition de la paroi vasculaire des gros vaisseaux. L'endothélium, la membrane basale et le tissu élastique interne forment la *tunica intima* ; la couche de muscle lisse avec la couche élastique externe composent la *tunica media* ; et enfin le tissu connectif (fibres élastiques et de collagène) forme la *tunica externa*.

B : Organisation des différents vaisseaux.

D'après (Cleaver O. 2003).

2.2.2 *La phase de maturation*

La première étape de la maturation du vaisseau est l'arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales avec la sécrétion de la matrice extracellulaire. La Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) a été décrite comme inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales via son récepteur Activin receptor-Like Kinase 1 (ALK1) (David L. 2007a). BMP9 pourrait jouer ce rôle lors de cette phase de maturation. Concernant la synthèse de la matrice extracellulaire, elle est induite par le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), via son récepteur ALK5, sur les cellules endothéliales et les fibroblastes (figure 4C) (Roberts A. B. 1989) (Krummel T. M. 1988).

Les jonctions endothéliales sont alors resserrées grâce à l'action de l'Ang1 (figure 4C) (Thurston G. 2000).

Enfin l'étape cruciale lors de cette maturation est le recouvrement des cellules endothéliales par les cellules murales. En effet, les vaisseaux non recouverts par ces cellules sont alors dégradés (Benjamin L. E. 1998). Les cellules mésenchymateuses précurseurs des cellules murales sont recrutées par le Platelet-Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) (figure 4C) (Hellstrom M. 1999) (Hellstrom M. 2001). La différenciation de ces précurseurs en cellules de muscle lisse ou en péricytes est induite par le TGF- β 1 sécrété par les cellules endothéliales (figure 4C) (Hirschi K. K. 1998) (Darland D. C. 2001).

2.2.3 *L'endothélium mature*

Bien que l'angiogenèse permette la formation de tous les types de vaisseaux (artères/artérioles/capillaires/veinules/veines), les endothéliums qui composent ces types de vaisseaux sont différents morphologiquement, moléculairement et dans leur fonction. De plus, l'endothélium des capillaires est hétérogène en fonction de l'organe (Cleaver O. 2003).

A la fin de l'angiogenèse, les vaisseaux sanguins matures sont composés d'une monocouche interne constituée par les cellules endothéliales, l'intima. L'intima est entourée par un ou des anneaux de cellules de muscle lisse (veines/artères), ou par un anneau de péricytes (capillaires), avec des fibres réticulaires (collagène III) et d'élastine. Cette couche forme la média. La couche la plus externe s'appelle l'adventice et est formée du tissu

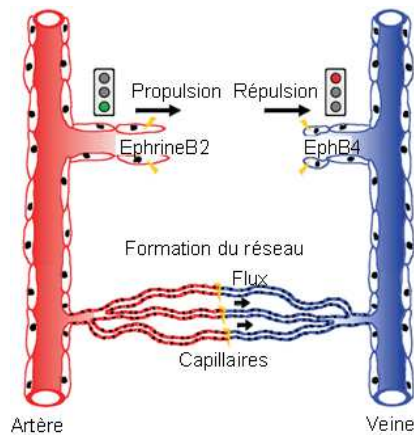
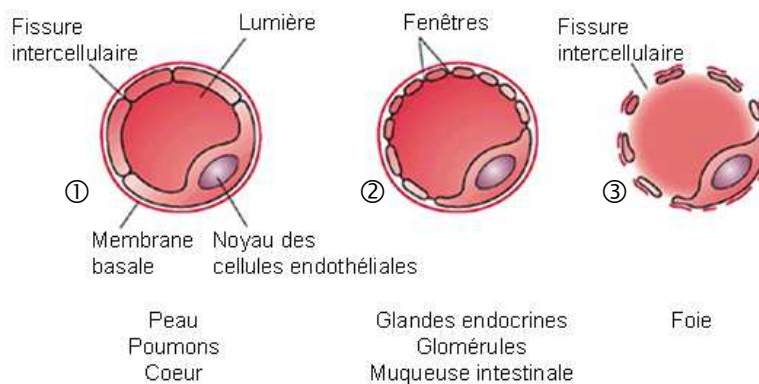


Figure 6 : Signalisation des éphrines dans la guidance vasculaire et formation des capillaires.

La signalisation d'EphrineB2 sur les cellules EphB4 induit une répulsion des cellules EphB4 positives (cellules veineuses), tandis que la signalisation inverse d'EphB4 sur EphrineB2 induit une attraction des cellules EphrineB2 positives (cellules artérielles). Ces formes d'attraction/répulsion aboutissent à l'établissement d'un réseau ségrégationniste. D'après (Fuller T. 2003).

A



B

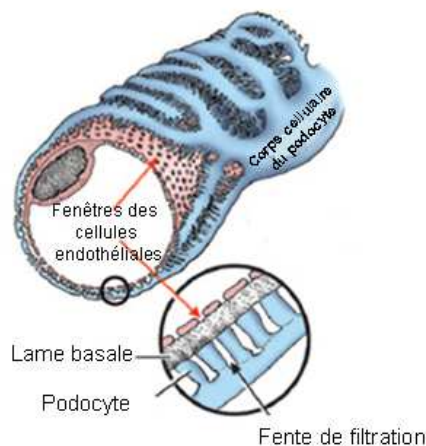


Figure 7 : Perméabilité de l'endothélium

A : Morphologie de la paroi capillaire dans différents tissus. ① Endothélium continu sans ouverture composé d'une couche continue de corps de cellules endothéliales. ② Capillaires fenêtrés avec des petites ouvertures, les fenêtrées, de 80 à 100 nm de diamètres. ③ Capillaires discontinus, appelés aussi sinusoides, avec des trous importants, des fenêtrées nombreuses et une lame basale discontinue. D'après (Cleaver O. 2003).

B : Gros plan d'un endothélium discontinu au niveau d'un glomérule de rein. D'après (Aird W. C. 2007a).

conjonctif, de fibres de collagène et de fibres élastiques (gros vaisseaux, absent dans les capillaires) (figure 5).

L'identité artérielle ou veineuse des cellules endothéliales est en partie génétique. En effet, il a été montré dans l'embryon de poulet que les cellules endothéliales de certains îlots sanguins expriment la Neuropiline 1 (Np1), qui est un co-récepteur du VEGF exprimé spécifiquement dans les artères, tandis que dans d'autres îlots sanguins les cellules expriment la Neuropiline 2 (Np2), corecepteur exprimé spécifiquement dans les veines (Herzog Y. 2005). Il existe d'autres marqueurs d'artères ou de veines exprimés avant l'établissement du flux sanguin et qui prouvent ainsi la détermination génétique de l'identité des cellules endothéliales. Un des couples les plus étudiés est le couple EphrinB2/EphB4. Le récepteur EphB4 est spécifiquement exprimé dans les veines, tandis que le ligand EphrinB2 est exprimé dans les artères (figure 6). Cette expression différentielle est mise en place avant l'établissement du flux sanguin (Wang H. U. 1998) (Gerety S. S. 1999). Ces découvertes rompaient le principe de différenciation artère/veine en fonction du flux sanguin, qui fut la première hypothèse avancée. Néanmoins, la plasticité des cellules endothéliales, c'est-à-dire le changement de phénotype artériel/veineux des cellules endothéliales, montre l'importance du flux dans la détermination de la nature artérielle ou veineuse, comme le montre l'acquisition progressive du phénotype artériel sur des veines greffées à la place d'artères (Moyon D. 2001) (Kwei S. 2004). Le caractère artériel ou veineux des cellules endothéliales semblent donc être à la fois dirigé par des facteurs génétiques mais aussi par des facteurs environnementaux comme le flux.

La fenestration des capillaires, qui régule les échanges d'eau, de solutés et de molécules, est également hétérogène dans l'organisme (figure 7). Dans la peau, les poumons et le cœur, l'endothélium est continu non fenêtré. L'eau et les solutés passent entre les cellules endothéliales, tandis que les grosses molécules passent par transcytose ou par des canaux transendothéliaux. Dans les glandes endocrines, les glomérules rénaux et la muqueuse gastro-intestinale, l'endothélium est continu fenêtré. L'eau et les solutés passent alors plus facilement que dans l'endothélium non fenêtré, mais les grosses molécules doivent passer par transcytose ou par les canaux. Enfin, dans le foie, l'endothélium est discontinu (sinusoïdal) ce qui permet aux grosses molécules de passer facilement au travers des perforations de l'endothélium (Aird W. C. 2007b). Notons pour terminer que dans le cerveau l'endothélium est associé à des astrocytes, permettant l'établissement de jonctions serrées sur l'endothélium continu, formant ainsi la barrière hémato-encéphalique, qui régule fortement l'endocytose et la transcytose (Cleaver O. 2003).

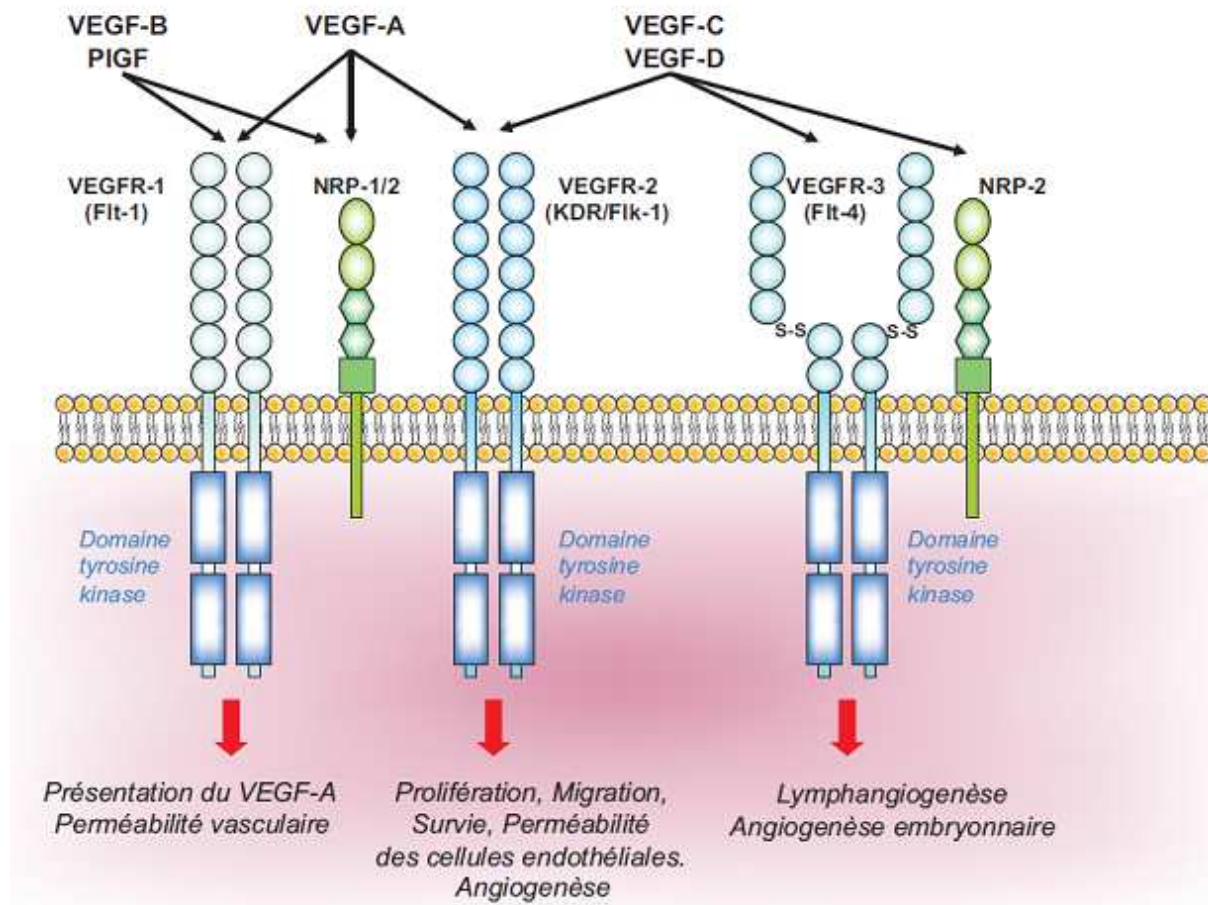


Figure 8 : Signalisation de la famille du VEGF.

Le VEGF-A se lie avec une haute affinité (K_d entre 100 et 500 pM) sur les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF-A ne se lie pas sur VEGFR-3. Le PlGF et le VEGF-B se lient uniquement au VEGFR-1. Le VEGFR-3 lie spécifiquement les VEGF-C et VEGF-D. NRP : Neuropiline. D'après (Feige J. J. 2009).

2.3 Les principaux facteurs de l'angiogenèse.

Je vais reprendre dans cette partie les principaux facteurs de l'angiogenèse déjà évoqués dans la partie précédente et les présenter plus en détail.

2.3.1 *La famille du VEGF : protéine clé de la phase d'activation*

Le facteur VEGF fut décrit en premier lieu par Senger et collaborateurs en 1983 comme un facteur de perméabilité vasculaire qu'ils dénommèrent Vascular Permeability Factor (VPF) (Senger D. R. 1983). C'est en 1989 que deux équipes de San Francisco purifièrent un facteur de croissance endothélial. Plouët purifia un facteur homodimérique mitogène des cellules endothéliales à partir d'une lignée de cellules de la glande pituitaire (Plouët J. 1989). Ferrara purifia ce même facteur de croissance endothéliale à partir du milieu conditionné de cultures primaires de cellules folliculaires d'hypophyse bovine, et l'appella VEGF (Ferrara N. 1989). Ferrara publia alors la séquence de ce facteur (Leung D. W. 1989) qui se révéla identique à la séquence du VPF (Keck P. J. 1989).

La famille du VEGF compte cinq membres. Le VEGF-A est le membre historique et le plus important pour son rôle central dans la phase d'activation de l'angiogenèse. Les autres membres sont VEGF-B (Olofsson B. 1996), VEGF-C (Joukov V. 1996) (Lee J. 1996), VEGF-D (Orlandini M. 1996) et le Placenta Growth Factor (PlGF) (Maglione D. 1991).

Il y a trois récepteurs à la famille du VEGF. Le premier à avoir été identifié est VEGFR-1 (appelé aussi FLT1 pour FMS-like-tyrosine kinase) (de Vries C. 1992). Un récepteur homologue a été décrit en 1992 : VEGFR-2 (appelé aussi FLK1 pour Fetal Liver Kinase) (Terman B. I. 1992) (Millauer B. 1993) (Quinn T. P. 1993). Enfin VEGFR-3 a été décrit par le groupe d'Alitalo (Aprelikova O. 1992). Un épissage alternatif pour VEGFR-1 a été décrit dès 1993, donnant un récepteur soluble (Kendall R. L. 1993). Ces récepteurs ont tous une activité tyrosine kinase. Neuropiline1 (NRP1) et neuropiline2 (NRP2) sont des co-récepteurs du VEGF (Neufeld G. 2002).

Les différents ligands de la famille du VEGF ne peuvent pas lier tous les récepteurs (figure 8). Ainsi, VEGF-A lie VEGFR-1 et VEGFR-2 (de Vries C. 1992) (Terman B. I. 1992), mais ne lie pas VEGFR-3. Ce dernier est exprimé uniquement dans le compartiment

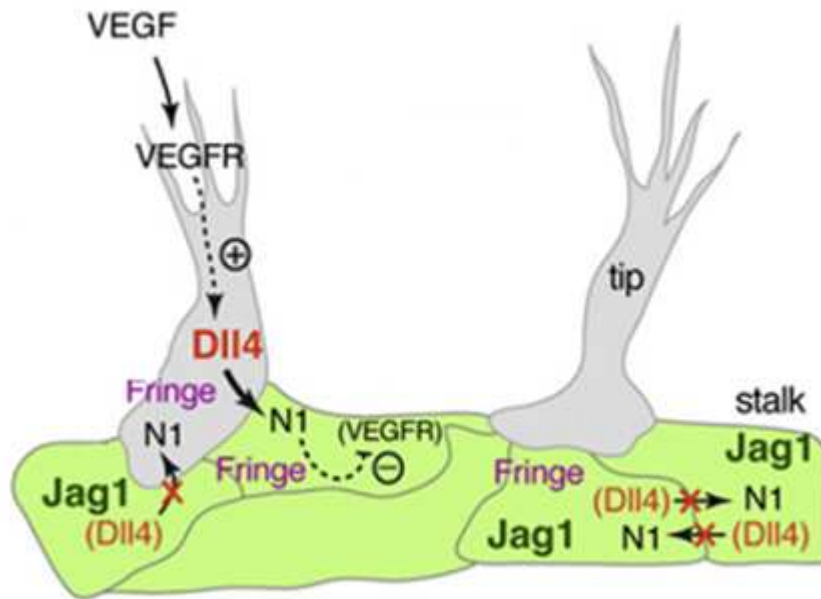


Figure 9 : Contrôle du bourgeonnement par la voie Notch.

VEGF-A induit l'expression de Dll4. La modification de Notch-1 (N1) par Fringe dans les "stalk cells" augmente la signalisation de Dll4, ligand présenté par les "tip cells". La signalisation de Dll4 dans les "stalk cells" réprime l'expression de VEGFR-2 et maintient un phénotype de "stalk cell". Jagged1 est un antagoniste de Dll4 qui diminue la signalisation de la voie Notch et promeut la signalisation du VEGF, ce qui augmente le bourgeonnement endothélial et l'angiogenèse. D'après (Benedito R. 2009).

lymphatique et lie VEGF-C et VEGF-D et est impliqué dans la lymphangiogenèse (Taipale J. 1999). VEGF-C est aussi angiogène via VEGFR-2 dans l'embryon murin (Joukov V. 1996).

Les cellules sécrètent du VEGF en réponse à une hypoxie (Liu Y. 1995) (Wang G. L. 1995). Comme déjà présenté précédemment, VEGF-A induit la phase d'activation de l'angiogenèse en augmentant la perméabilité des cellules endothéliales (Esser S. 1998) (Kevil C. G. 1998) (Kohn S. 1992) (Senger D. R. 1983), en stimulant leur prolifération (Connolly D. T. 1989) (Ferrara N. 1989) (Gospodarowicz D. 1989), en inhibant leur apoptose (Gerber H. P. 1998) et en favorisant leur migration (Dimmeler S. 2000). Cependant, les effets du VEGF-A sont dépendants de l'isoforme. En effet, le gène *VEGF-A* contient huit exons et génère plusieurs isoformes qui diffèrent dans leur partie C-terminale. Cette partie C-terminale leur confère des affinités différentes pour les héparanes sulfates de la membrane basale ce qui joue sur leur distribution dans les tissus (Houck K. A. 1992) (Park J. E. 1993). Plus récemment, de nouvelles isoformes ont été décrites, différant dans les six derniers acides aminés de la partie C-terminale. Ces isoformes, appelées isoformes b, ont des propriétés anti-angiogéniques. La première description de ces isoformes anti-angiogéniques a été faite par l'équipe de S.J. Harper (Bates D. O. 2002). Depuis plusieurs isoformes anti-angiogéniques ont été décrites (Qiu Y. 2009).

2.3.2 *La voie Notch : régulateur majeur du bourgeonnement*

La voie Notch a un rôle primordial dans le contrôle du bourgeonnement vasculaire (figure 9). La stimulation par le VEGF-A d'une cellule endothéliale induit le bourgeonnement. Afin de limiter le nombre de cellules en bourgeonnement, VEGF-A induit Dll4, ligand transmembranaire de la voie Notch. Dll4 lie alors sur les cellules adjacentes son récepteur, Notch1 (Hellstrom M. 2007). La liaison de Dll4 sur Notch1 induit le clivage du récepteur par une γ -sécrétase (Nichols J. T. 2007). La partie intracellulaire du récepteur, appelé NICD pour Notch IntraCellular Domain, conduit alors la signalisation Notch au niveau intracellulaire. Cette activation de la voie Notch régule négativement VEGFR-2, rendant les cellules moins sensibles au VEGF-A. Dll4 est très exprimé dans les cellules de pointe du bourgeon ("tip cells") et une régulation négative de Dll4 augmente le bourgeonnement endothélial (Hellstrom M. 2007). Jagged1, autre ligand transmembranaire de Notch1, est très exprimé dans les cellules de corps ("stalk cells") et absent des cellules de pointe ("tip cells"). Jagged1 lie Notch1 sans induire la signalisation Notch. Fringe est la protéine responsable de l'inactivation

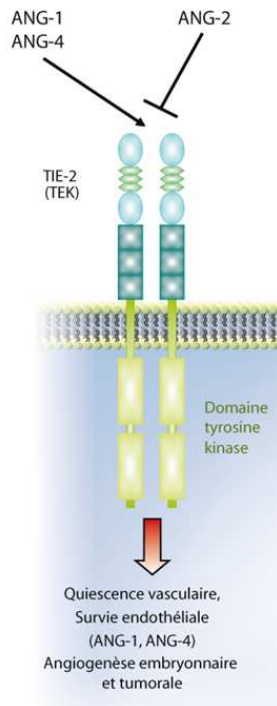


Figure 10 : Signalisation d'Ang1 et Ang2 sur Tie2.

La liaison d'Ang1 sur Tie2 induit la survie des cellules endothéliales, leur quiescence et l'établissement de jonctions serrées. La liaison d'Ang2, antagoniste du récepteur, provoque le relâchement des jonctions serrées et permet aux cellules de rentrer en prolifération. D'après (Feige J. J. 2009).

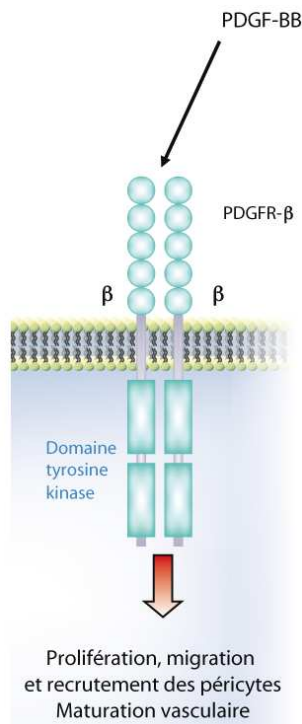


Figure 11 : Signalisation de PDGF-BB.

Le récepteur PDGF- β est très exprimé par les péricytes et sa signalisation par liaison de PDGF-BB, sécrété par les cellules endothéliales, induit la migration et la prolifération de ces péricytes. D'après (Feige J. J. 2009).

de la voie Notch par liaison de Jagged1 tout en conservant une activation de cette voie lorsque Dll4 se lie. Les effets de Jagged1 sont opposés à ceux de Dll4, Jagged1 étant un régulateur positif du bourgeonnement endothélial (Benedito R. 2009).

2.3.3 Les angiopoïétines : rôle biphasique de cette famille

Les angiopoïétines ont un rôle primordial dans la phase d'activation mais aussi dans la phase de maturation de l'angiogenèse. Il existe quatre angiopoïétines (Ang1 à 4) et deux récepteurs (Tie1 et Tie2) (Gale N. W. 1999). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales et hématopoïétiques (Sato T. N. 1993).

L'activité du récepteur Tie2 est bien caractérisée (figure 10). Le récepteur Tie2 a été découvert en 1993 par deux équipes (Runting A. S. 1993) (Sato T. N. 1993). Ang1 a été identifié comme agoniste du récepteur Tie2 en 1996 par l'équipe de Yancopoulos (Davis S. 1996). Ang1 induit l'autophosphorylation de Tie2 qui phosphoryle alors la protéine kinase Akt. Cette protéine induit la survie et la quiescence des cellules endothéliales (Fiedler U. 2006). Lors de l'activation de l'angiogenèse par le VEGF ou suite à une hypoxie, les cellules endothéliales sécrètent alors Ang2. L'équipe de Yancopoulos a montré qu'Ang2 est un antagoniste du récepteur Tie2 (figure 10). Ainsi, la liaison d'Ang2 sur Tie2 bloque la signalisation de Ang1 via Tie2 et induit un relâchement des jonctions intercellulaires (Maisonpierre P. C. 1997). Lors de la phase de maturation, l'arrêt de la sécrétion d'Ang2 permet le rétablissement de la voie Ang1/Tie2 et ainsi le resserrement des jonctions intercellulaires et la quiescence de l'endothélium (Thurston G. 2000).

2.3.4 Les PDGFs : acteurs du recouvrement des vaisseaux

Comme le nom l'indique, le PDGF (pour Platelet Derived Growth Factor) fut initialement purifié à partir de plaquettes (Antoniades H. N. 1979). On compte aujourd'hui quatre gènes (*pdgf-a* à *d*) qui codent pour cette famille de facteur de croissance. Ces facteurs sont fonctionnels sous formes dimériques (homo ou hétérodimères) et ont des séquences proches de celle du VEGF (Andrae J. 2008). Le dimère PDGF-BB est important dans l'angiogenèse puisqu'il est sécrété par les cellules endothéliales et se fixe sur le récepteur PDGF- β (un des deux récepteurs au PDGF) que les cellules murales expriment (figure 11).

Une signalisation paracrine est ainsi établie. Le PDGF stimule la prolifération des cellules de muscle lisse et des péricytes (D'Amore P. A. 1993), et augmente la stabilité de la paroi vasculaire en attirant ces cellules murales vers les néovaisseaux et en les accolant (Hellstrom M. 1999) (Larsson J. 2001) (Soriano P. 1994) (Lindahl P. 1997).

2.3.5 Famille TGF- β et BMPs : acteurs de la maturation des vaisseaux

La grande famille du TGF- β possède de nombreux membres dont le TGF- β 1 et BMP9. Cette famille sera présentée en détails ultérieurement.

2.4 Les principaux facteurs angiostatiques endogènes

Alors que beaucoup d'efforts ont été développés pour comprendre les mécanismes activateurs de l'angiogenèse, les connaissances sur les facteurs angiostatiques endogènes sont plus sommaires. Je vais présenter rapidement quelques facteurs.

Le premier facteur à avoir été décrit comme angiostatique est la thrombospondine-1 (TSP-1) (Good D. J. 1990). Cette protéine est complexée au TGF- β 1 dans les plaquettes (Armstrong L. C. 2003). Par son action sur CD36 et des intégrines, TSP-1 inhibe la migration des cellules endothéliales et induit leur apoptose (Lawler J. 1988) (Dawson D. W. 1997) (Jimenez B. 2000) (Short S. M. 2005).

L'endostatine est la protéine angiostatique la plus étudiée. C'est un fragment du collagène de type XVIII (O'Reilly M. S. 1997). Par son interaction avec de nombreuses protéines membranaires, dont les intégrines (Rehn M. 2001), l'endostatine réduit la migration des cellules endothéliales et interfère avec VEGFR-2 ce qui réduit la prolifération et la survie de ces cellules (Kim Y. M. 2002). De plus, l'endostatine active la caspase-9 (Dhanabal M. 1999) et donc l'apoptose tout en bloquant le cycle cellulaire (Hanai J. 2002). Notons juste que l'endostatine régule positivement certains facteurs proangiogéniques comme VEGF-A et régule négativement TSP (Abdollahi A. 2004).

La tumstatine est un fragment du collagène IV (Hamano Y. 2005). Par son interaction avec les intégrines, cette protéine inhibe la migration des cellules endothéliales et induit l'apoptose en activant la caspase-3 (Maeshima Y. 2000).

Microvascularisation normale

Microvascularisation tumorale

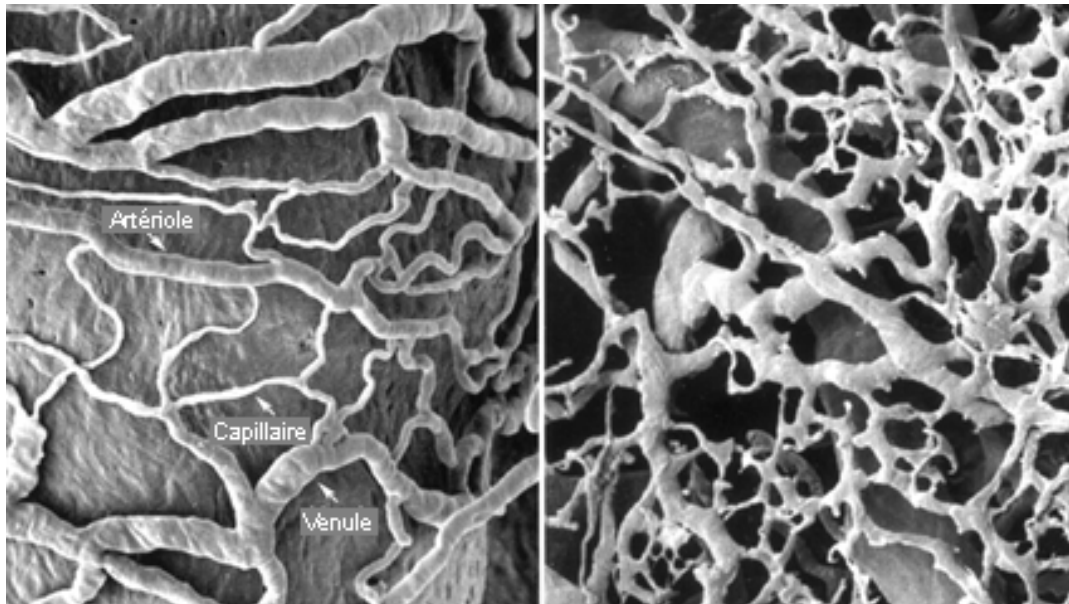


Figure 12 : Contraste entre la microvascularisation normale et tumorale.

A gauche, vascularisation du vasa vasorum du sinus carotidien du rat avec une organisation classique composée d'artérioles et de veinules séparées par des capillaires. A droite, vascularisation d'une tumeur (xénogreffe de tumeur humaine sur une souris immunodéprimée). La vascularisation est désorganisée, sans hiérarchie et avec des branchements excessifs. D'après (McDonald D. M. 2005).

Le facteur plaquettaire 4 est une cytokine qui inhibe la migration des cellules endothéliales en bloquant la régulation positive de deux métalloprotéases (MMP-1 et MMP-3) par la thrombine (Bikfalvi A. 2004).

Enfin, N. Ferrara montra en 1991 qu'un fragment N-terminal de la prolactine humaine inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Ferrara N. 1991).

2.5 Les pathologies impliquant l'angiogenèse et les traitements possibles

Après la naissance l'angiogenèse contribue à la croissance des organes, mais à l'âge adulte les vaisseaux sanguins restent quiescents et l'angiogenèse n'est présente dans les conditions physiologiques que dans le cycle ovarien et dans la grossesse. L'angiogenèse est aussi importante dans la réparation des tissus et la cicatrisation lors d'une blessure ou d'une ischémie. Cependant, l'angiogenèse est dérégulée dans certaines pathologies avec des cas où elle est excessive (comme le cancer, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)), et des cas où elle est insuffisante (comme la pré-éclampsie) (Carmeliet P. 2003).

2.5.1 *L'angiogenèse tumorale*

L'oxygène diffuse dans les tissus dans un rayon de 100 µm autour d'un capillaire (Folkman J. 2000) (Gatenby R. A. 2004). Les cellules tumorales ont donc besoin pour avoir un approvisionnement en oxygène ainsi qu'en nutriments et pour éliminer leurs déchets de mettre en place un réseau vasculaire. Cette mise en place du réseau vasculaire tumoral suit des mécanismes qui miment ceux de l'angiogenèse physiologique (Holash J. 1999). Cependant l'analyse fine de cette vascularisation fait apparaître des différences dans la structure des vaisseaux tumoraux par rapport à une vascularisation physiologique ([figure 12](#)). En effet, les vaisseaux tumoraux apparaissent dilatés, tortueux, perméables suite à la fenestration de l'endothélium, d'un espace transcellulaire et d'une membrane basale incomplète (Carmeliet P. 1996). De plus, la couverture en péricytes des vaisseaux tumoraux est faible (Benjamin L. E. 1999). Les facteurs de l'angiogenèse tumorale sont les mêmes que ceux décrits précédemment pour l'angiogenèse physiologique. Ainsi, le VEGF, induit très fortement par l'hypoxie (Wang G. L. 1995) (Liu Y. 1995), est sécrété par les cellules tumorales (Senger D. R. 1986)

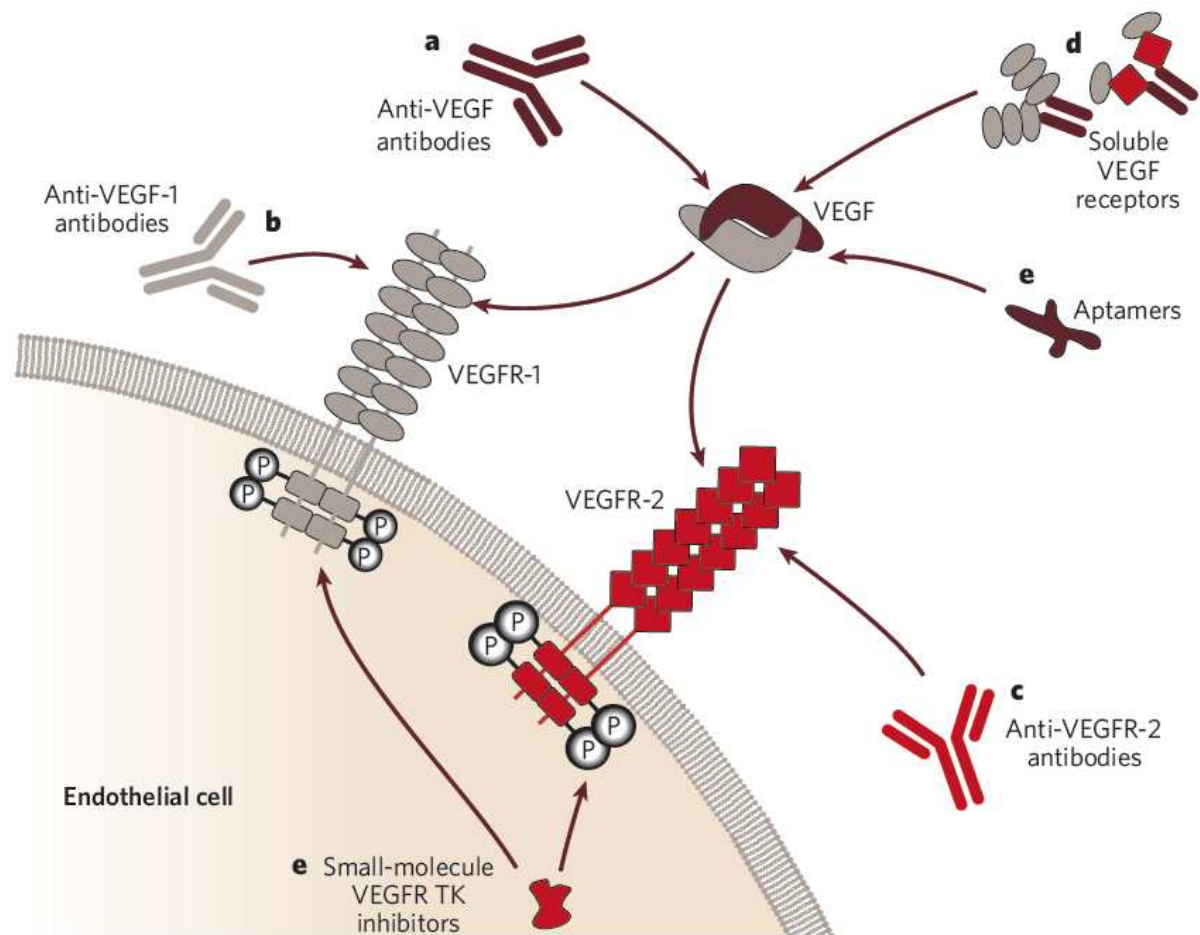


Figure 13 : Différentes stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ciblant la signalisation du VEGF.
D'après (Ferrara N. 2005).

(Ferrara N. 1999), et son niveau d'expression dans la tumeur est corrélé avec la densité des vaisseaux sanguins tumoraux (Takahashi Y. 1995). Cette vascularisation tumorale est donc primordiale pour la croissance de la tumeur mais peu fonctionnelle car déstructurée.

2.5.2 *Les thérapies de l'angiogenèse*

Afin de réguler l'angiogenèse dans ces pathologies, il existe des thérapies anti-angiogéniques pour les maladies à angiogenèse excessive et des thérapies pro-angiogéniques pour les maladies à angiogenèse insuffisante.

Je commencerai par présenter les thérapies anti-angiogéniques. Ces thérapies sont les plus développées de part leur implication dans les thérapies anti-cancéreuses. Depuis l'hypothèse de Folkman sur la possibilité de gérer la croissance tumorale en bloquant sa vascularisation (Folkman J. 1971), la découverte des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse a permis la mise en lumière de cibles moléculaires de l'angiogenèse et donc la mise au point de molécules chimiques et biotechnologiques pour bloquer ces cibles. Une revue récente de B. Teicher présente les thérapies anti-angiogéniques approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et en essais cliniques (Teicher B. A. 2011).

La voie du VEGF est la voie la plus ciblée dans ces thérapies (figure 13). Le premier traitement anti-angiogénique approuvé par la FDA fut le bevacizumab (commercialisé sous le nom d'Avastin, Genentech Inc.). Il s'agit d'un anticorps monoclonal ciblant le VEGF-A humain mis au point par l'équipe de Ferrara chez Genentech (Ferrara N. 2004). Son utilisation est aujourd'hui approuvée par la FDA dans les cancers métastatiques du colon et du poumon en complément des chimiothérapies conventionnelles. Le bevacizumab est aussi utilisé dans les maladies oculaires comme la DMLA, bien que seul le ranibizumab (fragment Fab du bevacizumab commercialisé sous le nom de Lucentis, Genentech Inc.) soit approuvé par la FDA. Depuis, trois autres thérapies ont été approuvées par la FDA. Il s'agit de trois inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur au VEGF. Ils sont utilisés dans le traitement des carcinomes rénaux (Sunitinib de Pfizer et Pazopanib de GSK) (Motzer R. J. 2007) (Sternberg C. N. 2009) (Ainsworth N. L. 2009), des tumeurs du stroma gastrointestinal (Sunitinib) (Theou-Anton N. 2009) et dans les carcinomes hépatiques (Sorafenib de Bayer Shering) (Llovet J. M. 2008).

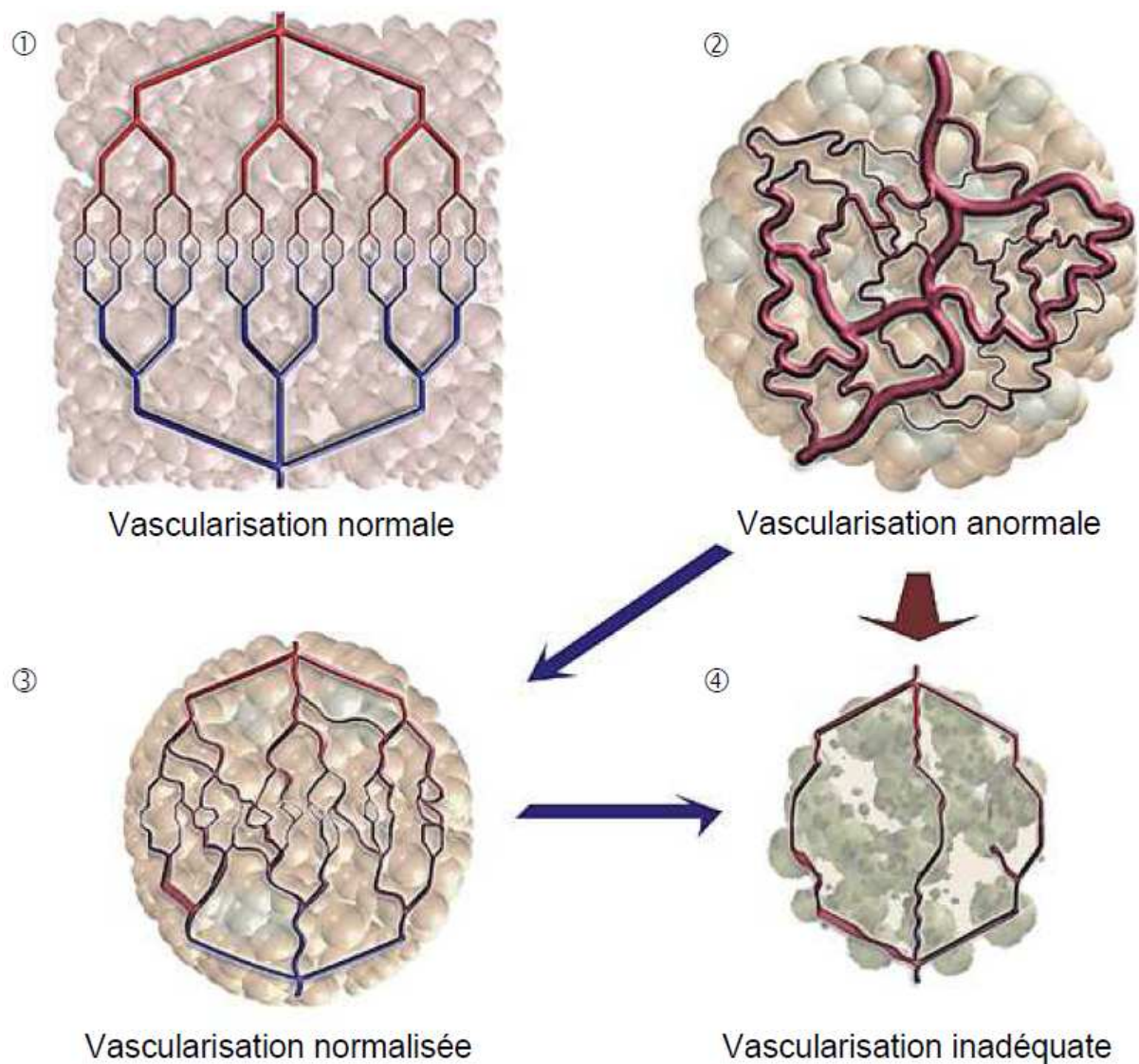


Figure 14 : Représentation schématique de l'évolution de la vascularisation tumorale lors d'une thérapie anti-angiogénique.

① Vascularisation normale composée de vaisseaux matures hiérarchisés. ② Vascularisation tumorale anormale, composée de vaisseaux immatures, perméables, tortueux, dont l'efficacité de perfusion est faible et entraîne une distribution des thérapies peu efficace. ③ Thérapies anti-angiogéniques induisant une disparition des vaisseaux immatures et aboutissant à un réseau plus structuré. La perfusion de la tumeur devient alors plus efficace permettant une bonne distribution des thérapies. ④ But ultime des thérapies anti-angiogéniques, la disparition de la vascularisation tumorale qui devient trop faible pour supporter la croissance tumorale. La tumeur régresse alors ou entre en dormance. D'après (Jain R. K. 2001).

De multiples essais cliniques sont en cours avec des stratégies diverses (récepteurs solubles, anticorps monoclonaux envers d'autres cibles que VEGF, inhibiteurs de récepteurs, anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs,...) (Teicher B. A. 2011).

Des résistances aux traitements sont fréquentes. Les inhibiteurs de kinase sont souvent inefficaces face à une forme mutée du domaine kinase du récepteur. Lors d'un traitement avec ces inhibiteurs, une sélection de cellules exprimant une forme mutée résistante au traitement peut se produire, ce qui aboutit à un échappement thérapeutique (Eikesdal H. P. 2009). En ce qui concerne le bevacizumab, les résistances pourraient s'expliquer par une augmentation des autres facteurs pro-angiogéniques qui compensent alors l'inhibition du VEGF (Kopetz S. 2010) (Zurita A. J. 2009).

L'hypothèse de Folkman (Folkman J. 1971) selon laquelle il serait possible de bloquer la croissance tumorale en inhibant l'angiogenèse tumorale est, bien qu'utilisée actuellement dans la recherche de nouvelles thérapies anti-cancéreuses, débattue. En effet, une autre hypothèse, portée par Rakesh Jain, propose que les traitements anti-angiogéniques normalisent la vascularisation des tumeurs (figure 14). Ainsi, les vaisseaux de la tumeur deviendraient plus fonctionnels grâce aux traitements anti-angiogéniques, ce qui permettrait une meilleure distribution des molécules utilisées dans le cadre des chimiothérapies (Jain R. K. 2005).

Les thérapies pro-angiogéniques sont développées pour rétablir une perfusion optimale d'un organe après une blessure, une chirurgie ou lors d'un accident vasculaire.

La première stratégie consistait à tester des molécules angiogènes (VEGF-A, VEGF-C, FGF-1, FGF2 et FGF-4) sur des patients avec une ischémie du myocarde ou d'un membre (Simons M. 2005). Les essais avec des protéines recombinantes ou des thérapies géniques n'ont cependant pas donné de résultat positif (Lederman R. J. 2002) (Henry T. D. 2003). L'utilisation d'un gène clé dans l'établissement de l'angiogenèse comme HIF (Hypoxia-Inducible Factor) est une perspective en thérapie génique (Heinl-Green A. 2005).

Une autre stratégie consiste en la transplantation de cellules angiogènes provenant de la moelle osseuse ou du sang. Les cellules sélectionnées étaient soit les monocytes périphériques, soit les cellules CD34⁺ après une stimulation de la moelle osseuse avec du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). La première étude a été conduite sur des patients avec une ischémie d'un membre. L'injection intramusculaire de cellules mononucléaires autologues a montré une amélioration significative de la perfusion du membre (Tateishi-Yuyama E. 2002). Une autre étude montre aussi des résultats positifs sur

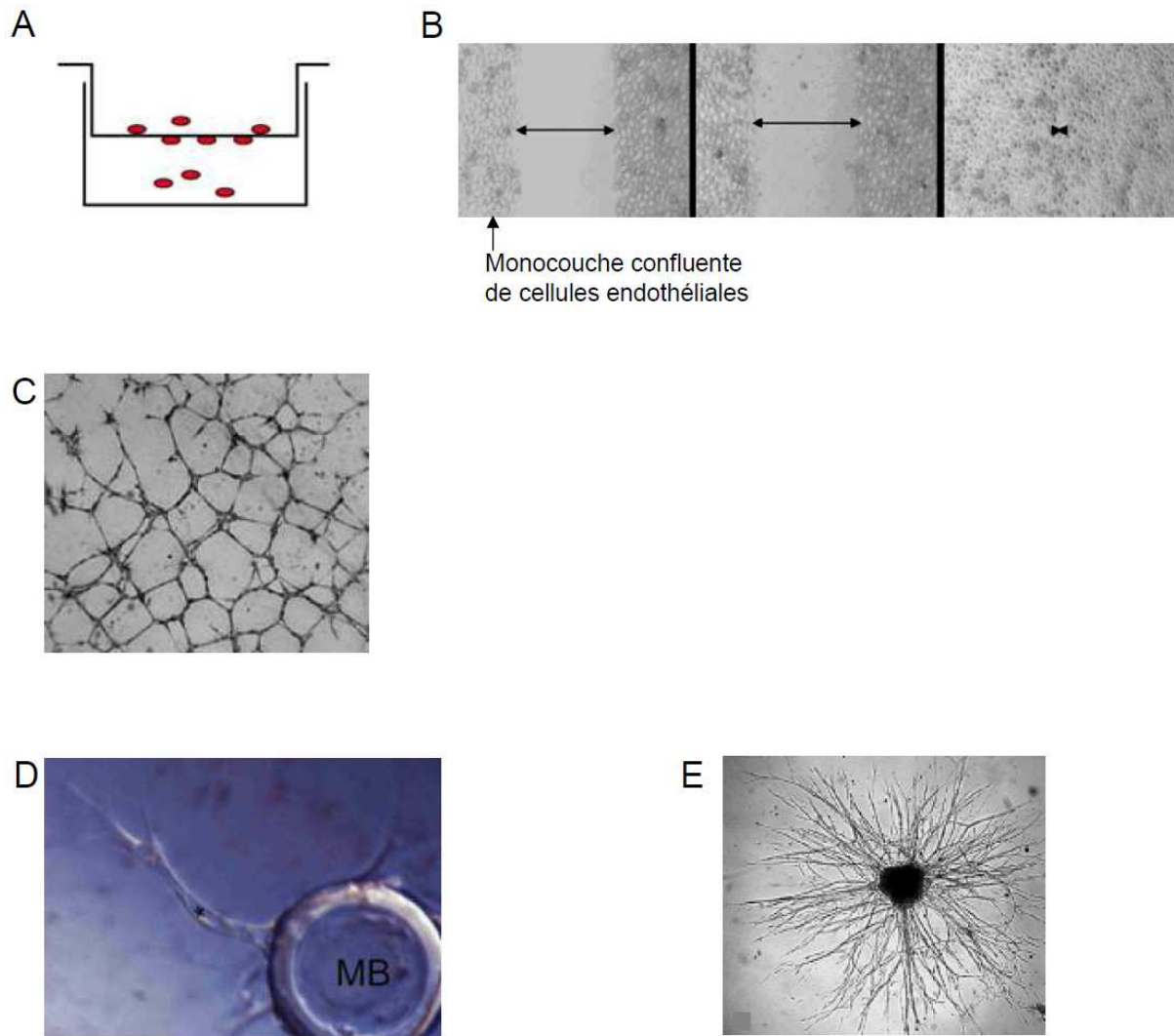


Figure 15 : Modèles d'angiogenèse *in vitro*

A : Modèle de migration avec une chambre de Boyden. Ce système comporte une chambre supérieure et une chambre inférieure, séparées par une membrane poreuse, qui peut être couverte de protéines matricielles (fibronectine, collagène, etc.) pour faciliter la migration. L'agent inhibiteur testé est placé dans la chambre supérieure et un facteur de croissance (comme du VEGF) est placé dans la chambre inférieure. Les cellules ayant traversé la membrane sont alors comptabilisées. D'après (Bikfalvi A. 2009)

B : Test de la blessure. Une monocouche confluente de cellules endothéliales est blessée et on suit la fermeture de cette blessure par migration des cellules. L'agent à tester est dans le milieu de culture. D'après (Wong T. S. 2010).

C : Formation de structures tubulaires par des cellules endothéliales sur une couche de Matrigel® (BD Biosciences). Le facteur à tester est dans le milieu de culture. D'après (Staton C. A. 2009).

D : Formation de tubules avec une lumière (*) par des cellules endothéliales sur une bille (MB : Microcarrier Bead) dans un gel de fibrine. D'après (Staton C. A. 2009).

E : Bourgeonnement de sphéroïdes de cellules endothéliales. D'après (Uriel S. 2006).

des patients atteints d'ischémie d'un membre ou coronarienne après transplantation de cellules sanguines (Henry T. D. 2003).

2.6 Les modèles d'étude de l'angiogenèse

Il existe différents modèles de l'angiogenèse permettant soit d'étudier un mécanisme précis (prolifération des cellules endothéliales, migration,...) soit d'étudier l'angiogenèse globale (implantation de tumeur,...). Je vais présenter dans cette partie les tests d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* avec leurs avantages et leurs inconvénients.

2.6.1 Modèles d'angiogenèse *in vitro*

L'utilisation de cellules endothéliales en culture a permis le développement de modèle d'angiogenèse *in vitro*. Ainsi il est possible de déterminer l'activité pro- ou anti-angiogénique d'une molécule en mesurant son action sur la prolifération ou la migration des cellules endothéliales par des tests classiques. Deux tests de migration sont couramment utilisés : les chambres de Boyden et le test de blessure (Staton C. A. 2004).

Les chambres de Boyden sont composées de deux compartiments superposés séparés par un filtre (figure 15A). Les cellules sont déposées sur le filtre et la molécule est déposée dans le compartiment inférieur. Une molécule qui stimulera la migration des cellules endothéliales par chimiotactisme attirera les cellules endothéliales dans le compartiment inférieur. Il suffit alors d'effectuer un simple comptage des cellules qui ont traversé le filtre (Alessandri G. 1983).

Le test de la blessure consiste à faire une "rayure" dans une couche confluyente de cellules endothéliales en culture (figure 15B). La vitesse de recouvrement de cette rayure est alors dépendante de la migration des cellules endothéliales et aussi de la prolifération (Pepper M. S. 1990) (Auerbach R. 1991).

Un test plus spécifique de l'angiogenèse consiste à étudier la formation de structure en tubules "capillary-like" des cellules endothéliales en culture sur une couche de Matrigel (une matrice membranaire riche en laminine) (figure 15C). Les cellules endothéliales forment spontanément des tubules lorsqu'elles sont en culture sur du Matrigel. Une molécule anti-



Figure 16 : Modèle d'angiogenèse *ex vivo* : bourgeonnement d'un anneau d'artère ombilicale humaine.
D'après (Staton C. A. 2009).

angiogénique déstructurera cette formation ou ralentira cet établissement (Lawley T. J. 1989) (Grant D. S. 1992) (Kanzawa S. 1993).

La formation de structure capillaire peut être étudiée en trois dimensions. Le premier test mis au point consiste à mettre en culture des cellules endothéliales sur des billes recouvertes de gélatine (Nehls V. 1995). Les billes sont ensuite déposées dans une matrice de fibrine. Les cellules endothéliales à la surface de ces billes vont alors former des bourgeons (figure 15D). Le nombre et la structure de ces bourgeons sont affectés par les substances contenues dans la fibrine. Le second test consiste à réaliser des sphéroïdes de cellules endothéliales dans des puits à fond rond non adhérent (Korff T. 1998). Les sphéroïdes sont ensuite déposés dans un gel de collagène ou de méthylcellulose contenant les substances à tester. Comme pour le test avec les billes, les sphéroïdes vont bourgeonner et les substances à tester peuvent modifier ce bourgeonnement (figure 15E). En faisant des sphéroïdes de cellules endothéliales et de cellules de muscle lisse, il devient possible d'obtenir des bourgeons de cellules endothéliales recouverts de cellules de muscle lisse et donc d'avoir un modèle d'angiogenèse *in vitro* proche de l'angiogenèse physiologique (Korff T. 2001).

Même si ces tests *in vitro* sont faciles et permettent le criblage de molécules, des limitations importantes sont à prendre en compte. Ainsi toutes les cellules endothéliales n'ont pas le même phénotype. Les cellules issues de gros vaisseaux et de capillaires n'expriment pas les mêmes marqueurs/récepteurs et répondent donc différemment aux stimuli. L'organe d'origine a aussi une importance (Jackson C. J. 1997). Il est aussi évident qu'une lignée de cellule endothéliale ne se comportera pas de manière similaire à des cellules endothéliales primaires. De plus, l'effet indirect d'une molécule, par une action sur des cellules non endothéliales qui produisent alors un composé actif sur les cellules endothéliales, n'est pas possible dans ces tests. Les tests *in vivo* sont alors indispensables.

2.6.2 Modèle d'angiogenèse *ex vivo*

Le modèle de bourgeonnement d'anneaux d'artère est très utilisé. Des segments d'artère de rat ou de souris sont mis en culture dans du Matrigel. Ces cultures d'organe peuvent alors former un réseau tridimensionnel (figure 16) (Nicosia R. F. 1990). Ce modèle présente l'avantage d'utiliser des cellules endothéliales non dégénérées par la culture cellulaire, de garder l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules murales et de

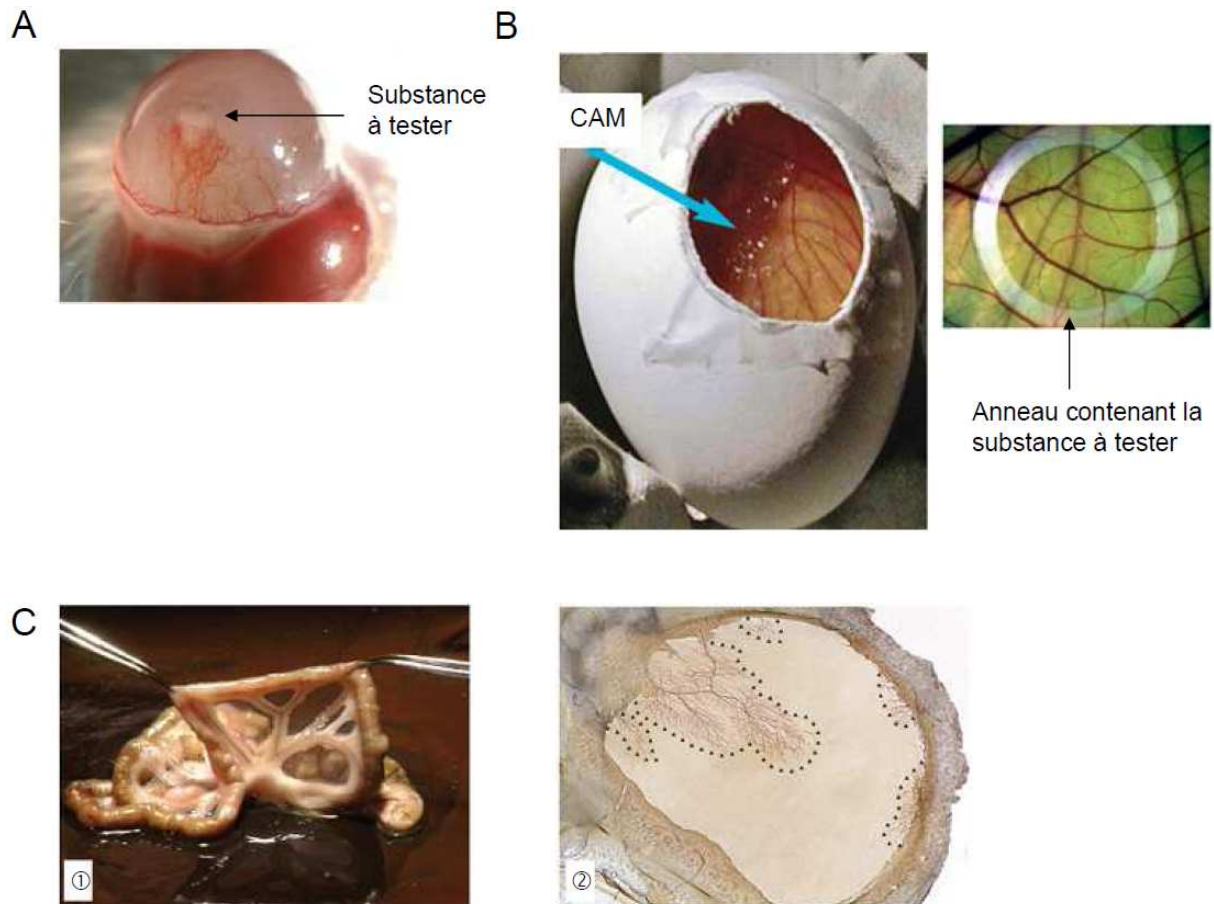


Figure 17 : Modèles d'angiogenèse *in vivo* – 1^{ère} partie.

A : Modèle de la cornée. Un implant contenant un inducteur de l'angiogenèse (ici du FGF2) et la substance à tester est inséré dans la cornée d'une souris. Les vaisseaux sont facilement visualisables. D'après (Auerbach R. 2003).

B : Modèle de la CAM où un disque contenant la substance à tester est déposé sur la membrane. D'après (Bikfalvi A. 2009) et (David L. 2008).

C : Modèle du mésentère du rat. ① Extraction de l'intestin grêle entier avec le mésentère. ② Marquage de l'endothélium du mésentère. D'après (Norrby K. 2006)

pouvoir tester un nombre de molécules relativement important avec un seul animal. C'est un très bon modèle intermédiaire entre les tests *in vitro* "purs" et les tests *in vivo*.

2.6.3 Modèles d'angiogenèse *in vivo*

Il existe de nombreux tests d'angiogenèse *in vivo*. Certains permettent l'étude de l'angiogenèse physiologique, d'autres de l'angiogenèse tumorale, ou encore permettent de tester l'effet d'une molécule sur l'angiogenèse. Je vais présenter les tests classiques d'étude de l'angiogenèse.

Un des tests les plus anciens est le test de la cornée présenté par Folkman et collaborateurs en 1974 (Gimbrone M. A., Jr. 1974). Initialement mis au point sur le lapin, ce test peut être réalisé sur des souris (Muthukkaruppan V. 1979). Un implant non vascularisé contenant une substance pro-angiogénique (VEGF/FGF) est inséré dans une poche créée dans le stroma de la cornée. Les substances à tester sont alors données par voie orale, ou systémique, ou encore par l'implantation de différents disques contenant ces substances dans des micropoches parallèles à la poche contenant l'implant principal dans la même cornée (figure 17A). L'avantage principal de ce modèle est la facilité de visualisation des vaisseaux grâce à la transparence des tissus. De plus, ce test permet une analyse quantitative de l'angiogenèse et l'observation non invasive permet des observations à long terme. Par contre, de nombreux désavantages sont à prendre en considération. Ainsi, ce test induit une angiogenèse atypique (la cornée étant normalement non vascularisée) ; est techniquement difficile, traumatique pour l'animal ; et l'exposition à l'oxygène due au site d'implantation peut affecter l'angiogenèse (Norrby K. 2006).

Un autre test introduit par Folkman en 1974 est la membrane chorioallantoïdienne (CAM) du poulet (Auerbach R. 1974) (Ausprunk D. H. 1974) (Ausprunk D. H. 1975). Une fenêtre est créée dans la coquille de l'œuf fertilisé d'une poule et un disque contenant la substance à tester est déposé sur la CAM exposée (figure 17B). Une alternative consiste à appliquer plusieurs disques contenant chacun une substance sur un embryon sans coquille, en boîte de Petri (Ribatti D. 1996). Simple et peu coûteux, ce test peut être utilisé pour des criblages *in vivo* et permet une observation non invasive. Par contre, ce modèle est très sensible au taux d'oxygène et une inflammation peut se produire ce qui interfère avec

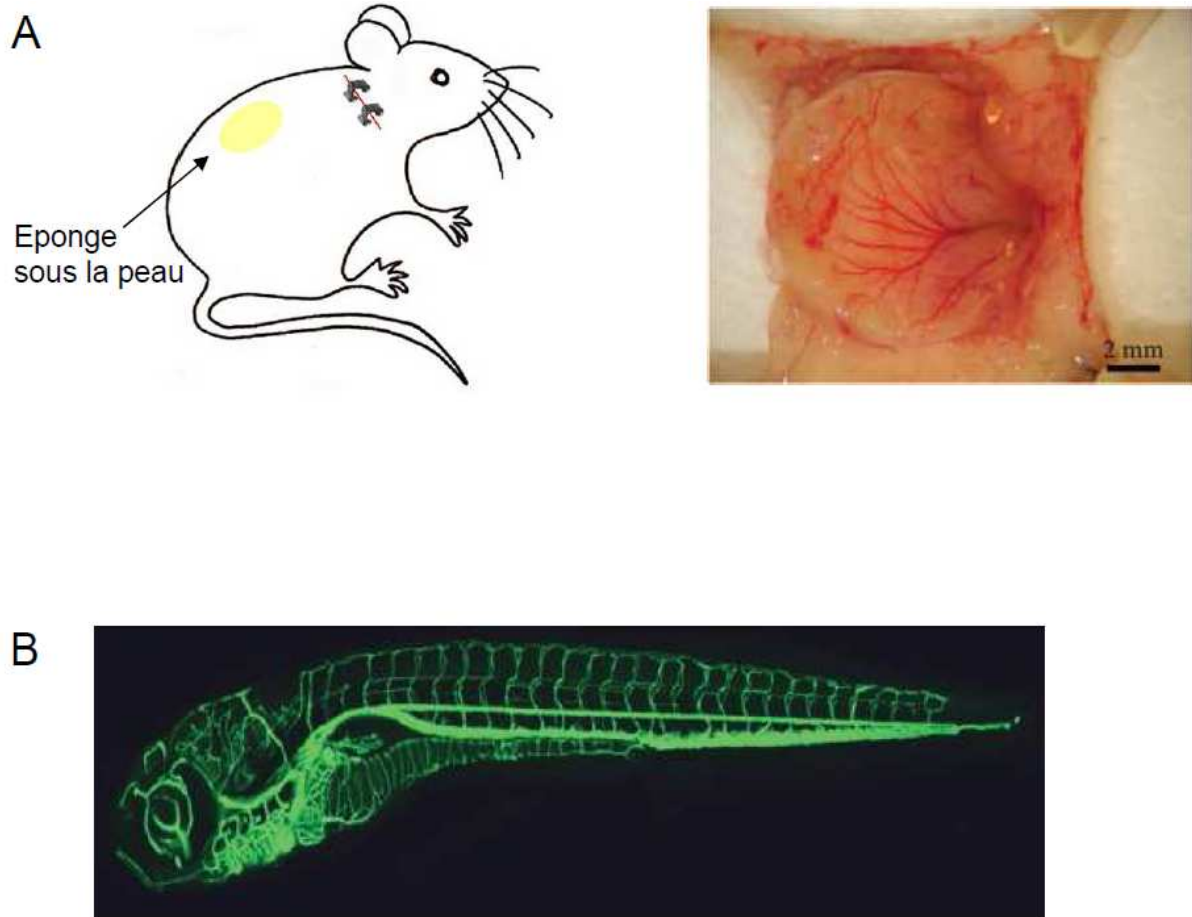


Figure 18 : Modèles d'angiogenèse *in vivo* – 2^{ème} partie.

A : Implantation d'un éponge en sous-cutané sur le dos d'une souris. Après des injections de FGF2 sur une semaine, un arbre vasculaire est visible dans l'éponge. D'après (David L. 2008).

B : Angiogramme d'une larve de poisson zèbre de 7 jours après fertilisation. Ce poisson exprime la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un promoteur endothélial. D'après (Staton C. A. 2004).

l'angiogenèse induite ou réprimée par les substances à tester. De plus, ce n'est pas un modèle sur mammifère, ce qui rend les résultats difficilement extrapolables pour l'homme (Norrby K. 2006).

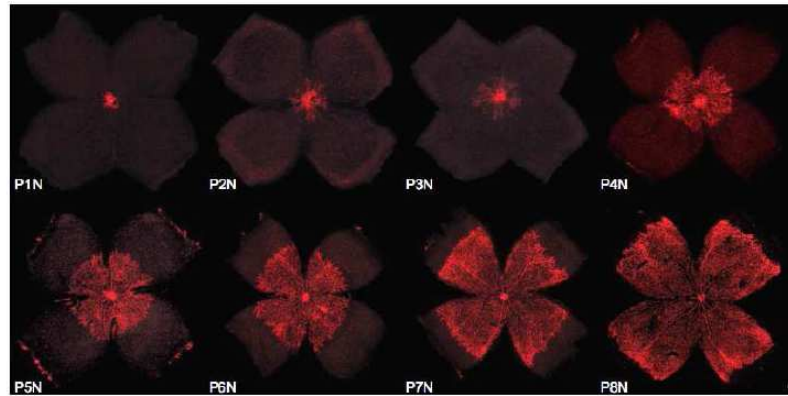
Le modèle du mésentère du rongeur a été présenté en 1986 (Norrby K. 1986). Le mésentère de l'intestin grêle du rongeur est extrêmement fin et se présente sous forme de fenêtre encadrée par du tissu graisseux portant une veine et une artère (figure 17C). Une substance, dont l'effet pro-angiogénique est à tester, est injectée en intra-péritonéal (IP) 2 fois par jour pendant 5 jours consécutifs. La solution injectée diffuse alors rapidement dans la cavité abdominale. Ainsi, des vaisseaux se développent dans les fenêtres initialement non vascularisées. Les avantages de cette méthode sont nombreux, comme la possibilité d'étudier l'effet systémique de la molécule, sa toxicité, son métabolisme. De plus, ce modèle est peu traumatisant et n'induit pas d'angiogenèse de la cicatrisation. Par contre, la quantification de l'angiogenèse dans les fenêtres est difficile (Norrby K. 2006).

En 1987, Andrade et collaborateurs ont développé un test en implantant une éponge contenant la substance d'intérêt sous la peau d'un rat (Andrade S. P. 1987). Ce modèle est aussi réalisable sur des souris (figure 18A). Il est alors possible de suivre la vascularisation de l'implant en mesurant le flux sanguin (en utilisant un gaz, le xénon : ^{133}Xe). Cette méthode, bien que reproductible et pouvant permettre le suivi continu de la vascularisation, présente des inconvénients comme une inflammation potentiellement gênante au site d'implantation. De plus, le suivi au xénon radioactif rend la manipulation difficile techniquement. Mais d'autres méthodes de quantification en expérience terminale existe comme le dosage de marqueurs endothéliaux (ex : CD31) ou de l'hémoglobine contenus dans l'éponge (Norrby K. 2006).

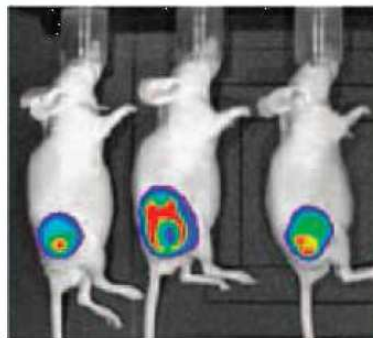
Le modèle de l'implant de Matrigel fut développé par Passaniti en 1992 (Passaniti A. 1992). Ce modèle simple techniquement consiste à injecter sous la peau d'une souris du Matrigel contenant une substance ou des cellules à étudier. Après 1 à 3 semaines, l'implant est retiré et l'examen histologique permet d'évaluer la vascularisation de ce dernier. La difficulté de réaliser un implant identique sur chaque animal a pour conséquence une variabilité relativement importante (Norrby K. 2006).

En 1999, un nouveau test a été décrit avec l'utilisation du poisson zèbre (figure 18B) (Serbedzija G. N. 1999). Ce test a la particularité de pouvoir observer l'angiogenèse

A



B



C

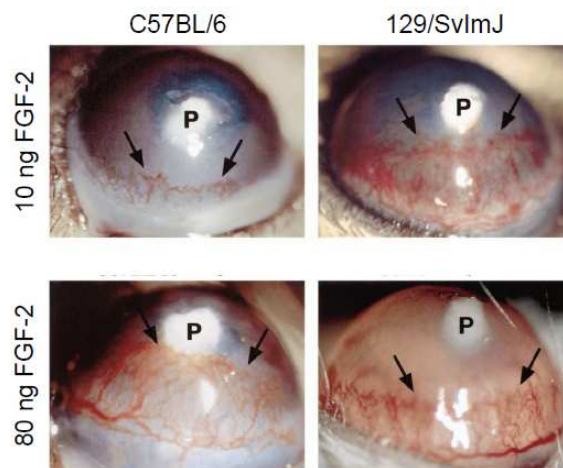


Figure 19 : Modèles d'angiogenèse *in vivo* – 3^{ème} partie.

A : Modèle de la rétine. Marquage à l'isolectine B4 de l'endothélium de la rétine de souris C57BL/6 âgée de 1 à 8 jours. La vascularisation se fait du centre de la rétine vers la périphérie. D'après (Stahl A. 2010).

B : Modèle d'implantation de cellules tumorales exprimant la luciférase en sous-cutané. La croissance tumorale est suivie par luminescence après injection de luciférine dans l'animal. D'après (Planel S. 2010).

C : Influence du fond génétique de la souris dans les modèles d'angiogenèse *in vivo*. Un implant (P) contenant 10 ou 80 ng de FGF-2 est introduit dans la cornée d'une souris C57BL/6 ou 129/SvImJ. A faible dose (10 ng), la vascularisation de la cornée est beaucoup plus importante dans les souris 129/SvImJ que dans les souris C57BL/6. Cette différence s'estompe à 80 ng ce qui prouve que les C57BL/6 peuvent répondre aux stimuli angiogènes mais sont moins sensibles que les 129/SvImJ. D'après (Rohan R. M. 2000).

physiologique sur un organisme entier, sans stimulation externe. La transparence de l'embryon dans les stades d'angiogenèse active permet en effet d'étudier la mise en place du réseau vasculaire en continu. Les molécules à étudier doivent simplement être déposées dans l'eau de l'aquarium. De plus, des morpholinos permettent de facilement éteindre un gène d'intérêt afin d'en étudier sa fonction (Egger S. C. 2000). La rapidité de croissance de cet animal, sa facilité d'élevage, sa grande reproductibilité, sa ressemblance dans son développement aux vertébrés supérieurs, la possibilité de modifier aisément l'expression d'un gène et sa facilité d'observation font du poisson zèbre un modèle de choix (Norrby K. 2006).

Un autre modèle d'angiogenèse physiologique sans stimulation externe est l'angiogenèse de la rétine de la souris. La rétine de la souris a la particularité de se vasculariser lors de la première semaine après la naissance (Connolly S. E. 1988). La vascularisation commence par le centre de la rétine, à l'embranchement du nerf optique, et une angiogenèse par bourgeonnement permet le développement du réseau vasculaire en une semaine vers la périphérie de la rétine (figure 19A). Le plexus primaire alors formé va pénétrer dans la rétine pour former un plexus profond. Lors de l'installation du plexus primaire, les vaisseaux formés sont très matures au centre de la rétine (les premiers vaisseaux formés) et peu en périphérie (les vaisseaux nouvellement formés), ce qui permet l'étude de l'angiogenèse dans ces différentes phases avec l'observation d'une seule rétine. La différenciation artère/veine est aussi facilement identifiable puisque les artères ont un espace non vascularisé autour d'elles, contrairement aux veines. Les cellules de tête (tip cells) sont aussi très facilement visualisables à la limite de l'apparition des vaisseaux. En utilisant des souris modifiées génétiquement ou en injectant des substances à tester dans les nouveaux-nés, il est alors possible d'étudier l'effet de ce gène/cette substance dans un contexte d'angiogenèse non provoquée (Gariano R. F. 2005) (Fruttiger M. 2007) (Uemura A. 2006).

Enfin, les modèles de croissance tumorale, par injection dans des souris de cellules de lignées tumorales, permettent l'étude de l'effet de substances anti-angiogéniques dans le développement tumoral (figure 19B). Plusieurs paramètres sont à prendre en compte. Ainsi, l'utilisation de souris immunodéprimées, qui évite le rejet des cellules cancéreuses par rapport à des souris immunocompétentes, ne permet pas d'étudier l'action du système immunitaire. L'utilisation de souris immunocompétentes nécessite l'injection de cellules cancéreuses syngéniques. L'injection de cellules en sous-cutané, qui permet de suivre la croissance tumorale facilement par rapport à une injection orthotopique (plus difficile pour le

suivi, sauf en utilisant un appareil d'imagerie, et plus difficile techniquement), est un modèle moins relevant puisqu'il ne préserve pas le microenvironnement des cellules, crucial pour l'étude de l'angiogenèse. Le mode d'administration des drogues (intraveineuse ou intrapéritonéale par rapport à intratumoral) doit aussi être pris en compte. L'angiogenèse est alors étudiée par marquage immunohistochimique des vaisseaux sanguins (marquage CD31 par exemple) (Bibby M. C. 2004).

Pour terminer cette partie sur les modèles *in vivo* d'angiogenèse, je tiens à souligner l'importance du fond génétique des souris utilisées lors des expériences. En effet, plusieurs publications montrent que la sensibilité des souris aux différents stimuli angiogéniques (par exemple le VEGF-A, ou FGF2) est dépendante de la souche utilisée (figure 19C). Ainsi, lors de l'utilisation du test de la cornée avec une stimulation par un implant contenant 10 ng de FGF2, une souris C57BL/6J a une aire de vascularisation de 0,6 mm², contre 1,4 mm² pour les BALB/cJ et 2.5 mm² pour les 129/SvImJ (Rohan R. M. 2000). Un lien entre la réponse aux stimuli angiogéniques et le nombre de cellules endothéliales circulantes (CEC) et des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) a été mis en évidence. Ainsi 1 µL de sang de 129/SvImJ contient entre 12 et 32 CECs et 2 à 7 PECs, contre 0 à 3 CECs et 0 à 1 PECs dans 1 µL de sang de C57BL/6J (Shaked Y. 2005). Il apparaît ainsi crucial de bien choisir le fond génétique utilisé lors de tests d'angiogenèse *in vivo*.

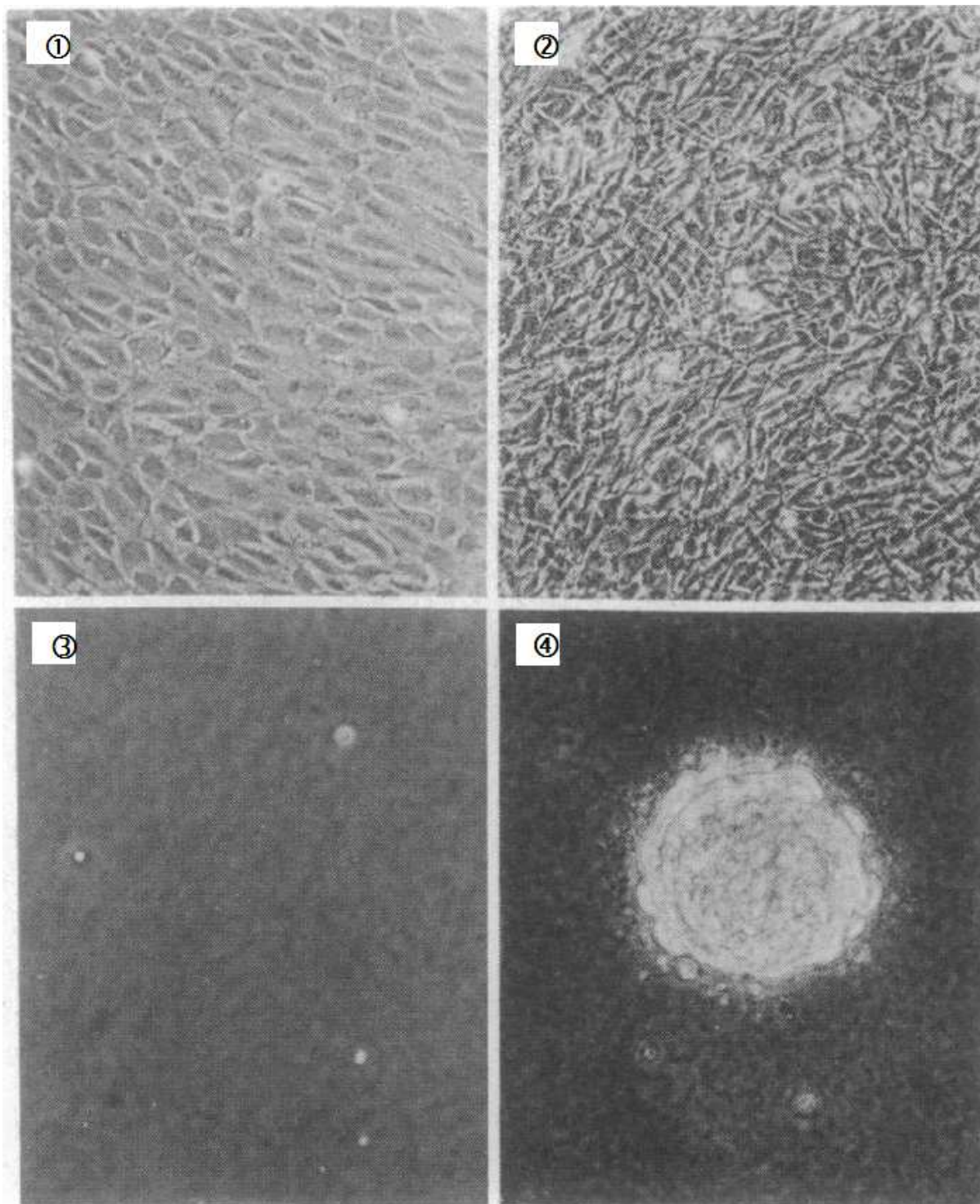


Figure 20 : Découverte du TGF- β .

Culture de fibroblastes de rat infectés par le Moloney Sarcoma Virus. ① Cellules adhérentes sans SGF. ② Cellules adhérentes avec SGF. ③ Cellules en agar mou sans SGF. Aucune colonie ne s'est formée. ④ Cellules en agar mou avec SGF. Des colonies se sont formées. D'après (de Larco J. E. 1978).

Partie 2 : La signalisation de la famille TGF- β .

1. La famille TGF- β : une famille nombreuse.

La famille TGF- β comprend une trentaine de facteurs de croissance structurellement reliés. Ces membres régulent une multitude de processus cellulaires dont la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la mobilité, l'adhésion et la mort cellulaire. L'expression de ces facteurs est retrouvée dans une grande variabilité d'organismes vivants, des drosophiles aux mammifères supérieurs. Je vais présenter dans cette partie les membres de cette famille et leurs récepteurs.

1.1 Les ligands de la famille TGF- β

1.1.1 Bref historique

A la fin des années 1970, les scientifiques ont mis en évidence l'existence de facteurs de croissance contrôlant la prolifération des cellules et présents dans le sang, le sérum, les fluides interstitiels, et les extraits cellulaires. Robert Holley, prix Nobel de médecine en 1968, suggéra que les cellules malignes pouvaient échapper à ce contrôle de la prolifération en requérant moins de facteurs de croissance (Holley R. W. 1975). De Larco et Todaro publièrent alors qu'une cellule (ici des fibroblastes) infectée par un virus (ici le Moloney Sarcoma Virus) produit un facteur qui induit la transformation phénotypique d'une cellule non infectée. Ils appelèrent ce facteur "Sarcoma Growth Factor" (SGF) et ils vérifièrent son effet transformant en mesurant la capacité des cellules à pousser en agar mou ([figure 20](#)) (de Larco J. E. 1978). Sporn et Todaro émirent alors l'hypothèse d'une boucle autocrine dans la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules cancéreuses, ce qui expliquerait le besoin plus faible des cellules cancéreuses en facteurs de croissance exogènes (Sporn M. B. 1980). Plusieurs laboratoires pensèrent alors que le SGF pouvait être un facteur autocrine et essayèrent de le purifier. Le laboratoire de Sporn fit alors une découverte importante. En effet, lorsqu'ils passèrent un extrait contenant du SGF en chromatographie d'exclusion stérique, ils

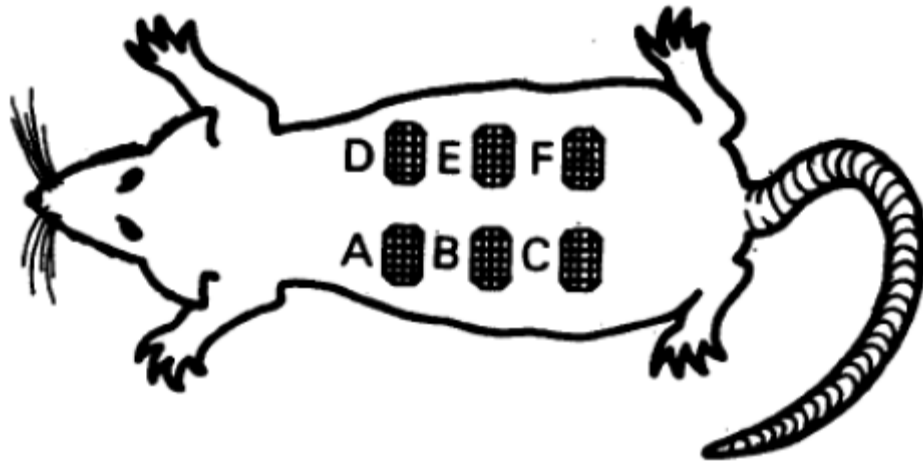


Figure 21 : Modèle expérimental pour tester l'effet de TGF- β sur la cicatrisation.

Des chambres en acier contenant du TGF- β ou de l'albumine de sérum bovin sont placées sur le dos du rat. Les taux de protéine, d'ADN et de collagène contenus dans la chambre 5 à 9 jours après son implantation étaient largement supérieurs dans celle contenant le TGF- β , montrant ainsi un effet positif du TGF- β sur la cicatrisation. D'après (Sporn M. B. 1983).

se rendirent compte qu'aucune des fractions n'était active dans le test de croissance des cellules en agar mou. Par contre, lorsque deux fractions étaient réunies l'activité était alors restaurée. Ils montrèrent ainsi que SGF était en fait composé de deux constituants au moins (Anzano M. A. 1982). Une des fractions avait un constituant qui induisait quelques colonies de fibroblastes en agar mou et liait le récepteur au facteur de croissance de l'épiderme (EGF). Ce facteur a été nommé Transforming Growth Factor α (TGF- α). Le second constituant ne liait pas le récepteur à l'EGF et n'induisait une croissance des cellules en agar mou qu'en présence de TGF- α ou d'EGF. Ce facteur fut alors nommé TGF- β . Afin de mieux caractériser ce nouveau facteur, des équipes ont cherché à purifier une grande quantité de TGF- β à partir de tissus. Le TGF- β humain fut alors détecté en abondance dans le placenta (Frolik C. A. 1983) et les plaquettes sanguines (Assoian R. K. 1983). Bien que son nom suggère une expression dans les cellules transformées uniquement, cette découverte démontra l'expression du TGF- β dans des cellules non transformées. Le premier rôle de TGF- β a été décrit dès 1983 par Sporn et collègues en évoquant son implication dans la cicatrisation, via une induction de la synthèse de collagène et de l'angiogenèse ([figure 21](#)) (Sporn M. B. 1983), effets confirmés par la suite (Roberts A. B. 1986). L'analyse du TGF- β purifiée à partir de plaquettes montra sur gel d'acrylamide une unique bande à 25 kDa en condition non réductrice, et une unique bande à 12,5 kDa en condition réductrice, montrant ainsi que le TGF- β actif est un dimère dont les unités sont liés par un ou des ponts disulfures (Frolik C. A. 1983) (Assoian R. K. 1983) (Roberts A. B. 1983). La purification de ce TGF- β et sa commercialisation permirent le commencement des études fonctionnelles du TGF- β . Ainsi, l'effet inhibiteur du TGF- β sur la croissance de certaines cellules fut décrit dès 1984 (Tucker R. F. 1984b). Les premières recherches du récepteur au TGF- β par test de liaison furent publiées la même année (Frolik C. A. 1984) (Tucker R. F. 1984a) et la séquence du TGF- β a été connue dès 1985 (Derynck R. 1985). La forme active du TGF- β est alors apparue comme le dimère de la partie C-terminale d'une protéine précurseur bien plus longue. Le caractère multifonctionnel du TGF- β a été mis en lumière par les travaux de Roberts. L'équipe montra en effet que TGF- β induit la croissance des cellules Myc-1 lorsque du PDGF est présent mais l'inhibe lorsque du EGF est présent (Roberts A. B. 1985). Dès lors, l'effet du TGF- β sur les cellules est apparu contexte dépendant.

Ce bref historique présente la découverte du TGF- β 1. A la fin des années 1980, simultanément à la découverte des isoformes humaines du TGF- β (TGF- β 2 et TGF- β 3), d'autres protéines synthétisées sous forme de précurseur et possédant au moins sept des neuf

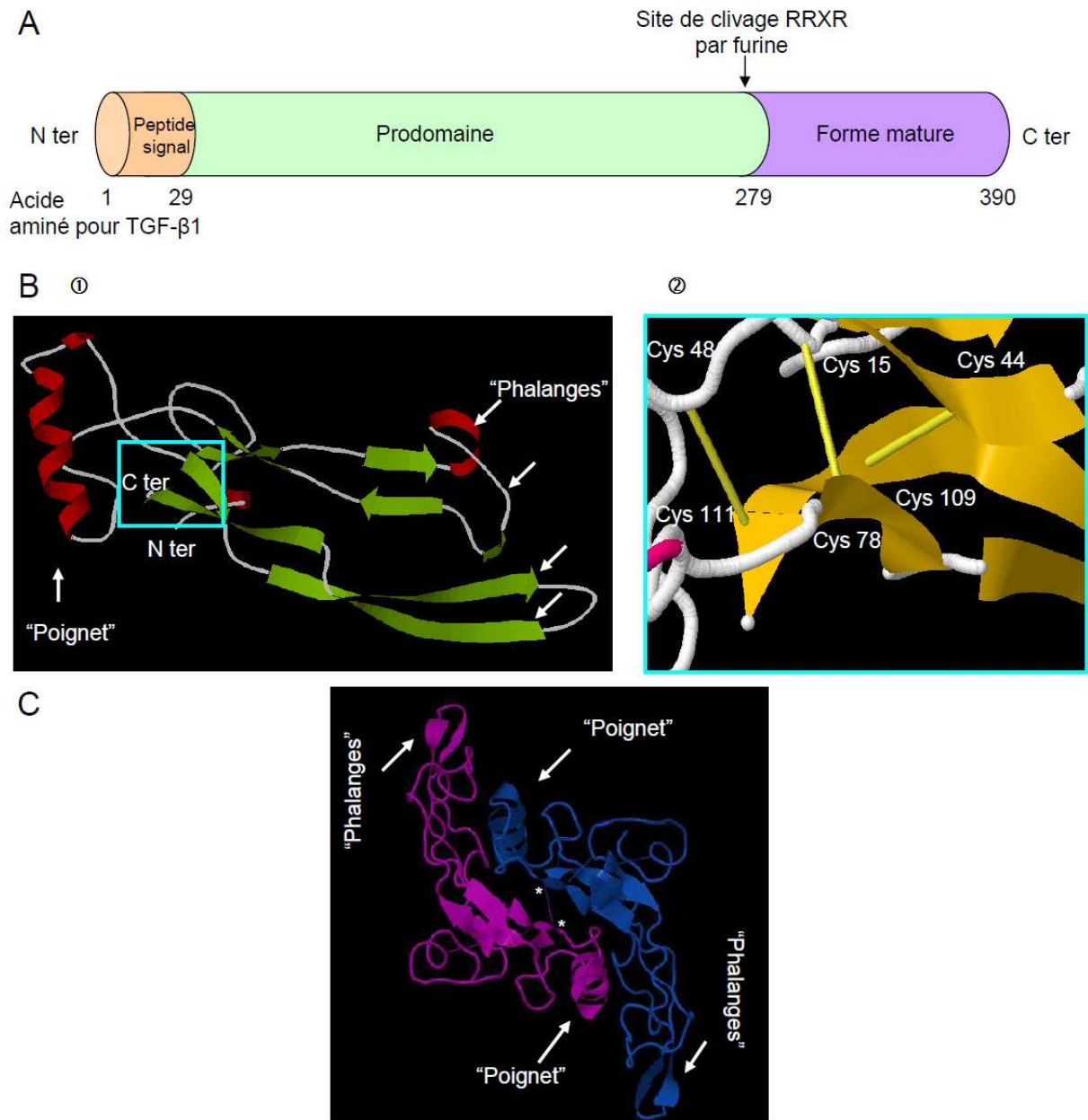


Figure 22 : Structures des membres de la famille TGF- β .

A : Représentation schématique du précurseur des membres de la famille TGF- β . Ce précurseur comporte un peptide signal de sécrétion, un prodomaine (appelé LAP pour TGF- β), un site de clivage à la furine et une forme mature.

B : Structure cristallographique d'un monomère de la forme mature TGF- β 2. ① Cette structure à la forme d'une main gauche. ② Gros plan sur le nœud cystéique. Les ponts disulfures entre les cystéines 44 – 109 et 48 – 111 forment une boucle dans laquelle passe le pont disulfure entre les cystéines 15 et 78. D'après (Schlunegger M. P. 1992).

C : Structure cristallographique du dimère de forme mature de TGF- β 1. La dimérisation se fait par un pont disulfure interchaîne entre les cystéines 79 (*) des deux monomères. D'après (Hinck A. P. 1996).

cystéines de la partie C-terminale du TGF- β ont été identifiées. Ces protéines constituent la superfamille du TGF- β .

1.1.2 Les membres de la superfamille du TGF- β

La connaissance des séquences de l'activine, de l'inhibine (Mason A. J. 1985), de l'hormone anti-Müllerienne (AMH) (Cate R. L. 1986) et du TGF- β 2 (de Martin R. 1987) (Madisen L. 1988) ainsi que du TGF- β 1 (Derynck R. 1985) a permis de montrer l'existence de protéines produites sous la forme d'un précurseur, clivées pour donner une forme active et sécrétées sous forme d'un dimère lié par un pont disulfure (figure 22A). Dès lors, l'existence d'une superfamille du TGF- β a été fortement suggérée (Massague J. 1987) (Sporn M. B. 1987). Bien que les séquences de ces protéines présentes parfois peu de similarité, la conservation du domaine C-terminal du prodomaine et la conservation de sept au moins des neuf cystéines de la partie C-terminale des formes matures est une marque d'appartenance à cette superfamille (Massague J. 1987). La structure des membres a montré une particularité : la présence d'un nœud cystéique (figure 22B). Ce nœud cystéique est constitué de deux ponts disulfures formant une boucle dans lequel passe un troisième pont disulfure (Daopin S. 1992) (Schlunegger M. P. 1992). Il existe quatre grandes familles à nœud cystéique : le NGF (Neural Growth Factor), le PDGF, les hormones glycoprotéiques (comme l'hCG pour human chorionic gonadotropin) et le TGF- β .

Les membres de la famille TGF- β ont une structure globale proche. Les monomères ont la forme d'une "main gauche" avec le poignet et les phalanges (figure 22B) (Sebald W. 2004). Chaque monomère comporte plusieurs feuillets β organisés par le nœud cystéique. Le dimère prend alors la forme d'un "papillon", les deux faces concaves de la "main" étant face à face (figure 22C).

Aujourd'hui, la superfamille du TGF- β comporte 37 membres identifiés chez l'homme, bien que le séquençage du génome humain ait identifié 42 cadres de lecture pouvant coder pour des ligands de cette superfamille (Lander E. S. 2001). Les membres identifiées comportent les isoformes du TGF- β , les activines et les inhibines, l'AMH, la famille du GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor), les GDFs (Growth and Differentiation Factors) et les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) (figure 23).

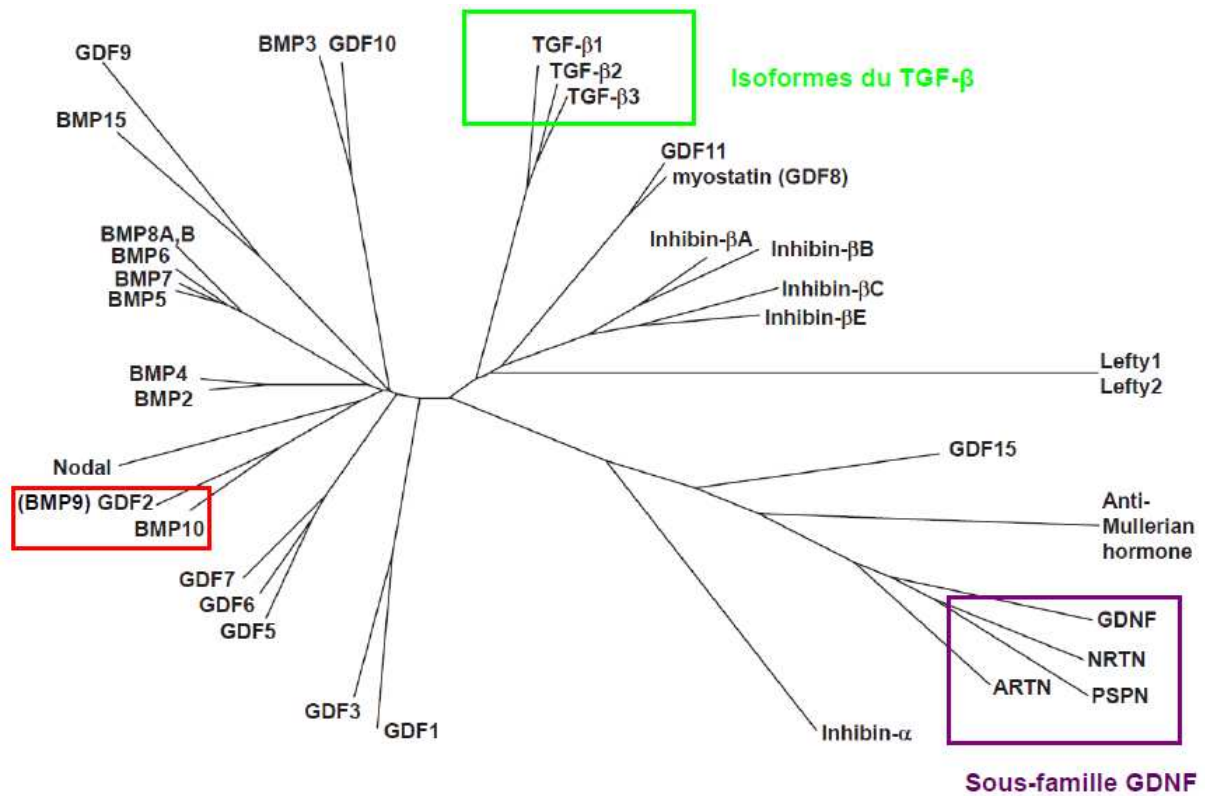


Figure 23 : Arbre phylogénétique déraciné des 37 membres de la famille TGF-β chez l'homme.
D'après (Shi M. 2011).

La famille des isoformes du TGF- β comporte cinq membres, dont trois chez les mammifères. TGF- β 1 fut le premier membre de cette superfamille cloné (en 1985 (Derynck R. 1985)), puis vient TGF- β 2 (de Martin R. 1987) (Madisen L. 1988) et enfin TGF- β 3 (ten Dijke P. 1988). L'isoforme TGF- β 4 fut détecté dans le poulet (Jakowlew S. B. 1988a) (Jakowlew S. B. 1988b) et l'isoforme TGF- β 5 dans *Xenopus laevis* (Kondaiah P. 1990), mais ces isoformes n'ont pas été trouvées chez les mammifères. Une forme hétérodimérique TGF- β 1/TGF- β 2 a été décrite dans les plaquettes porcines (Cheifetz S. 1987).

L'idée d'une substance soluble produite par les testicules et agissant sur l'hypophyse pour inhiber la sécrétion de gonadotropines a été postulée par McCullagh dès 1932 (McCullagh D. R. 1932). Il appela cette substance inhibine en rapport à sa fonction. Mais il fallut attendre 1985 et les travaux de Ling pour avoir une caractérisation de cette substance. Il montra alors que l'inhibine était composée de deux sous-unités différentes liées par un ou des ponts disulfures et inhibait la sécrétion de FSH (Follicule Stimulating Hormone) mais pas de LH (Luteinizing Hormone) (Ling N. 1985). La même équipe publia la séquence cette année là des deux sous-unités (α pour la grande unité et β_A ou β_B pour les deux petites unités existantes) et classa ainsi l'inhibine comme un membre de la superfamille TGF- β (Mason A. J. 1985). Enfin Ling publia un an plus tard qu'un dimère (homo- ou hétérodimère) des sous-unités β avait une activité opposée à l'inhibine. Il appela cette substance l'activine (Ling N. 1986a).

L'hormone anti-Müllerienne (AMH) est responsable de la régression des canaux de Müller, à l'origine de l'appareil génital femelle, dans les embryons mâles. Son existence a été pressentie par Jost dès 1953 (Jost A. 1953). La séquence a été connue en 1986 (Cate R. L. 1986).

Le membre "fondateur" de la famille du GDNF a été caractérisé et séquencé en 1993 par Lin (Lin L. F. 1993). Il est décrit comme un des membres les plus éloignés de la famille TGF- β . Son rôle est principalement dans la survie des neurones dopaminergiques.

La dernière sous-famille est celle des BMPs. L'existence de substances stimulant la synthèse osseuse fut décrite dès 1965 par Urist (Urist M. R. 1965). Les premières BMPs séquencées furent BMP1 (qui est en fait un metalloprotéase et qui ne fait pas partie de la famille TGF- β), BMP2 et BMP3 (Wozney J. M. 1988). Initialement décrites pour leur rôle dans l'induction de l'ossification, ces protéines sont maintenant nommées par le nom plus générique de GDF pour Growth and Differentiation Factor. Cette famille compte aujourd'hui une vingtaine de membres (Xiao Y. T. 2007).

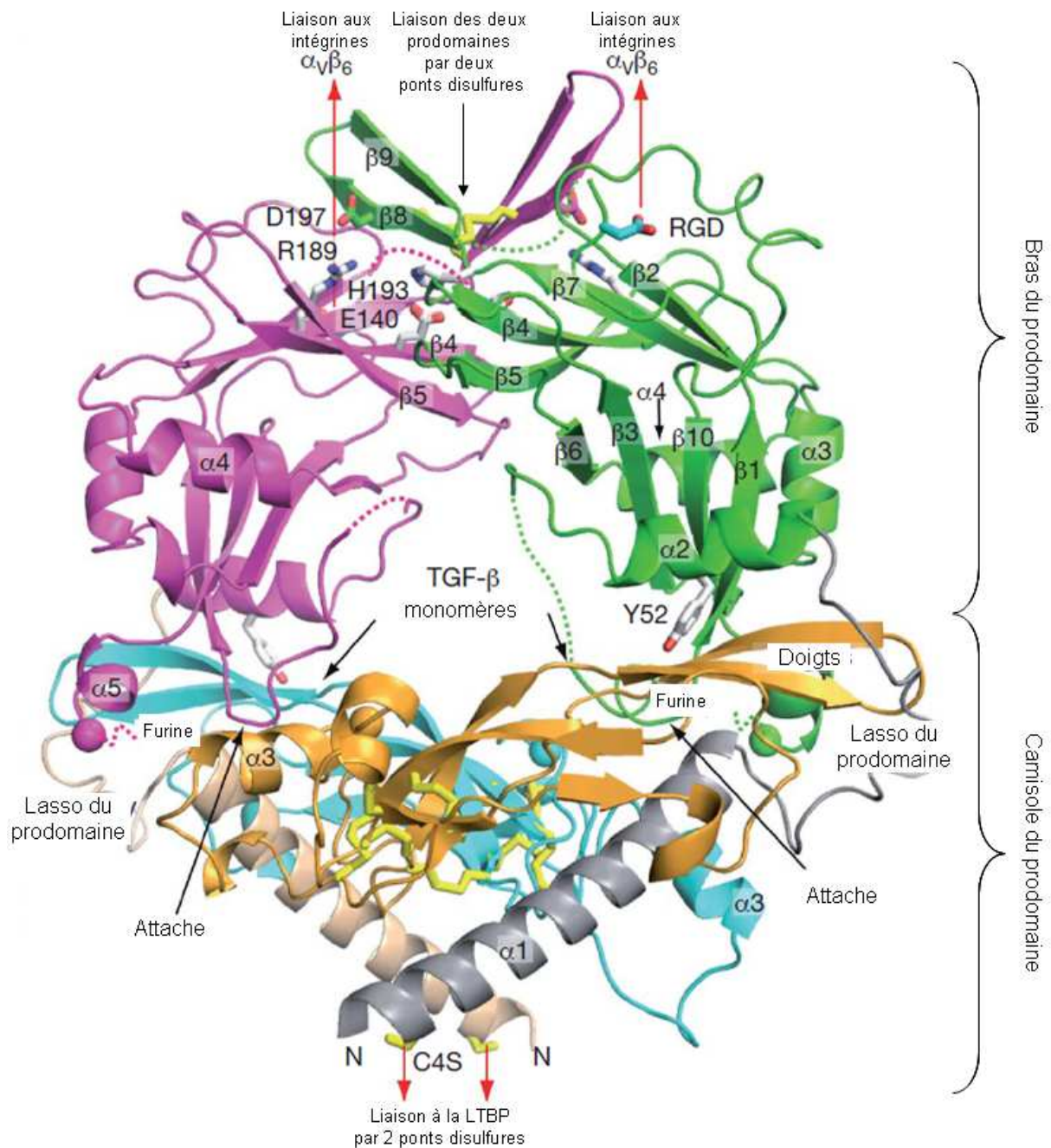


Figure 24 : Architecture du proTGF-β1.

Les deux monomères de la forme mature sont en bleu et orange. Les deux parties du prodomaine (bras et camisole) sont colorés différemment. Les ponts disulfures intrachaines et interchaines sont en jaune. Les flèches rouges représentent les directions des forces exercées sur le prodomaine pendant l'activation par les intégrines. Les domaines RGD servent de site de liaison aux intégrines. Le lasso du prodomaine entoure les doigts du TGF-β1, site de fixation au récepteur de type 2. L'attache du prodomaine lie par liaisons hydrogènes (donc liaisons non covalentes) le TGF-β1 mature. Le clivage par la furine (aux sites "furine") entre le prodomaine et la forme mature se passe après la formation de la structure tertiaire. D'après (Shi M. 2011).

Enfin, d'autres GDFs font partie de la superfamille TGF- β comme GDF8 (appelé aussi myostatin pour son rôle d'inhibiteur de la croissance et différenciation des cellules des muscles squelettiques).

La famille TGF- β est retrouvée dans un grand nombre d'organismes comme *Drosophila melanogaster* (sept membres) (Parker L. 2004), *Caenorhabditis elegans* (quatre membres) (Savage-Dunn C. 2001), et *Xenopus laevis* (quinze membres). Ces organismes plus simples que des mammifères ont servi de modèles de choix pour l'étude du fonctionnement de la superfamille TGF- β . Les fonctions de ces membres sont très diverses mais fondamentales dans le développement et la réparation des tissus.

1.1.3 Synthèse des ligands

Les ligands de la famille TGF- β comportent quatre domaines : un peptide signal responsable de la sécrétion du peptide, un prodomaine, un site de clivage par des protéases de type furine, et le domaine mature (figure 22A). Après traduction de ces cytokines sous forme d'un propeptide, les ligands sont clivés dans le trans-Golgi par les furines convertases (Gentry L. E. 1990) (Dubois C. M. 1995). Le clivage peut aussi avoir lieu après sécrétion de la protéine. L'AMH est d'ailleurs principalement clivée après sécrétion (Wilson C. A. 1993). Le prodomaine ainsi libéré reste lié au domaine mature par des liaisons non covalentes (Lawrence D. A. 1991). Le prodomaine est absolument indispensable pour la bonne conformation du ligand (Gray A. M. 1990).

Le membre le plus étudié pour sa sécrétion est le TGF- β 1. Le dimère mature de TGF- β 1 est associé à son prodomaine appelé LAP (Latent Associated Protein) (Gray A. M. 1990). Cette forme est totalement inactive. La LAP assure un contrôle de l'activité du TGF- β , de sa biodisponibilité par interaction avec des protéines de la matrice extracellulaire ainsi que la bonne conformation du ligand. La structure du TGF- β latent (dimère de forme mature + LAP) a été réalisée très récemment (Shi M. 2011). Cette structure montre que les deux prodomaines forment une sorte de losange (figure 24). A l'extrémité de ce losange, les prodomaines se croisent et sont liés par deux ponts disulfures. Chaque prodomaine porte un domaine RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartique) de liaison à l'intégrine α_v . A l'extrémité opposée, les prodomaines présentent chacun une cystéine (Cys 4) qui forment un pont disulfure avec une

protéine de la famille des LTBP (Latent TGF- β binding protein). Les ponts disulfures liant la LTBP à la LAP se font entre deux cystéines en N-terminal de chaque prodomaine et deux cystéines d'une LTBP (ratio prodomaine : LTBP de 2 : 1). Il n'y a pas de liaison covalente entre le dimère mature et le LTBP. (Miyazono K. 1988) (Gleizes P. E. 1996, Saharinen J. 1996). Il existe à ce jour quatre membres de la famille des LTBP (LTBP 1-4). Le dimère de TGF- β mature est emprisonné dans les deux bras du "losange" formés par le prodomaine du côté des cystéines des liaisons aux LTBP (Shi M. 2011). Notons que la dimérisation du prodomaine par ponts disulfures n'est pas conservée pour tous les membres de la famille (Shi M. 2011). En effet, les séquences des prodomaines sont peu conservées et une absence de cystéine dans les feuillets β 7, 8 ou 9 de certains membres (comme BMP9 et BMP10) implique une absence de dimérisation du prodomaine. La cocrystallisation des formes clivée et non clivée montre que la conformation du prodomaine, de la forme mature et leur association n'est pas dépendante du clivage (Shi M. 2011). Le prodomaine maintient TGF- β sous une conformation différente de celle du TGF- β libre ou lié aux récepteurs et empêche l'accès de TGF- β aux récepteurs.

L'activation des formes latentes peut se produire par différents mécanismes. L'exemple le plus connu est TGF- β . In vitro, il est possible de dissocier le dimère mature TGF- β des prodomaines en chauffant le complexe à 80°C pendant 10 mn, en faisant varier le pH (solution acide ou basique), en utilisant des agents chaotropiques ou des détergeants (Lawrence D. A. 1985) (Brown P. D. 1990) (Gleizes P. E. 1997). Les radicaux libres oxydatifs peuvent aussi activer TGF- β (Barcellos-Hoff M. H. 1996). In vivo, l'acidification (pH<3) de l'espace extracellulaire des ostéoclastes peut expliquer l'activation du TGF- β lors de la résorption osseuse (Oreffo R. O. 1989). Les radicaux libres oxydatifs seraient aussi à l'origine de l'activation du TGF- β consécutive à une irradiation (Barcellos-Hoff M. H. 1994). Deux processus enzymatiques peuvent aussi activer TGF- β . Les glycosidases (endoglycosidase-F, sialidase, neuraminidase, N-glycanase) activent TGF- β (Miyazono K. 1989). Le virus de la grippe activerait TGF- β en utilisant une neuraminidase (Schultz-Cherry S. 1996). La dégradation protéolytique des prodomaines permet aussi l'activation du TGF- β . Les protéases à sérine (plasmine, cathepsine D) clivent le domaine N-terminal des prodomaines, activant ainsi TGF- β (Lyons R. M. 1988) (Lyons R. M. 1990). Enfin, l'interaction de la LAP avec la thrombospondine-1 ou 2, protéine fortement présente dans les plaquettes, active TGF- β (Schultz-Cherry S. 1994) (Souchelnitskiy S. 1995). Une autre méthode d'activation est l'exercice d'une force par les intégrines sur la LAP. La liaison des intégrines $\alpha_v\beta_6$ sur les domaines RGD des prodomaines n'est pas suffisante pour libérer

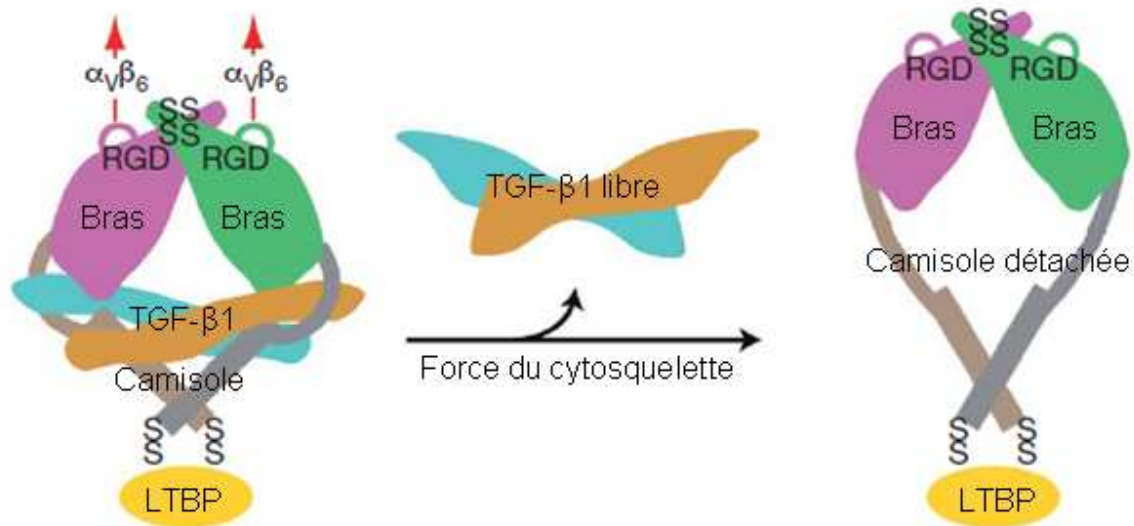


Figure 25 : Représentation schématique de la structure de proTGF- β 1 et du mécanisme d'activation.

SS : pont disulfure. Les flèches rouges indiquent le sens de la traction exercée par les intégrines sur les prodomaines. D'après (Shi M. 2011).

TGF- β (Annes J. P. 2004) (Wipff P. J. 2008) (Munger J. S. 1999). L'activation du TGF- β par les intégrines requiert l'attachement des prodomaines à une LTPB, l'attachement des intégrines au cytosquelette et une contraction cellulaire exerçant une force sur les prodomaines (Annes J. P. 2004) (Wipff P. J. 2008) (Munger J. S. 1999) (Yoshinaga K. 2008). La structure de la LAP associée à TGF- β a confirmé la nécessité d'exercer une force sur les LAPs pour libérer TGF- β (figure 25) (Shi M. 2011). En effet, la LTBP ancre une extrémité des LAPs fermement dans la membrane extracellulaire. Les intégrines connectent les autres extrémités au cytosquelette d'une cellule. La contraction de cette cellule induit une force de traction sur les LAPs qui se déforment et libèrent ainsi TGF- β . Le TGF- β libéré peut alors se lier à ses récepteurs.

En ce qui concerne les autres membres de la famille TGF- β , ils sont tous synthétisés sous la forme d'un précurseur, dimérisés puis clivés dans l'appareil de Golgi ou dans l'espace extracellulaire. L'association des prodomaines avec le dimère de forme mature donne un complexe qui n'est pas toujours inactif. Ainsi, GDF8 (la myostatine) (Thies R. S. 2001), GDF11 (Ge G. 2005) et BMP10 (Sengle G. 2010) sont inactifs lorsque les prodomaines sont présents, similairement à TGF- β . Par contre BMP2 (Israel D. I. 1992), BMP4 (Sopory S. 2006), BMP5 (Sengle G. 2010), BMP7 (Jones W. K. 1994), BMP9 (Brown M. A. 2005), l'AMH (Wilson C. A. 1993), Nodal (Le Good J. A. 2005) et GDF15 (Bauskin A. R. 2000) (Fairlie W. D. 2001) sont actifs associés à leur prodomaine. Il est à noter que le prodomaine de l'AMH se détache lors de la liaison de l'AMH sur son récepteur de type 2 (di Clemente N. 2010). Il est possible de penser alors qu'un ligand qui a une affinité pour son prodomaine supérieure à celle pour son récepteur est inactif lorsque couplé à son prodomaine, alors qu'un ligand qui a une affinité plus forte pour son récepteur que pour son prodomaine sera actif même s'il est couplé à ce dernier, le récepteur pouvant "capturer" le ligand.

Les prodomaines sont des régulateurs de la stabilité des formes matures des ligands et donc de leur demi-vie. Ainsi le prodomaine de nodal confère peu de stabilité à la forme mature de nodal, tandis que le prodomaine de BMP4 stabilise fortement la forme mature de nodal (Constam D. B. 1999).

Une fois synthétisés, les ligands vont agir par liaison sur leurs récepteurs spécifiques.

Notons que des hétérodimères de BMPs ont été observés *in vitro* et *in vivo* (BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7, BMP4/7). Ces hétérodimères apparaissent plus actifs que leurs respectifs homodimères (Little S. C. 2009) (Valera E. 2010) (Carpenter R. S. 2010) (Israel D. I. 1996).

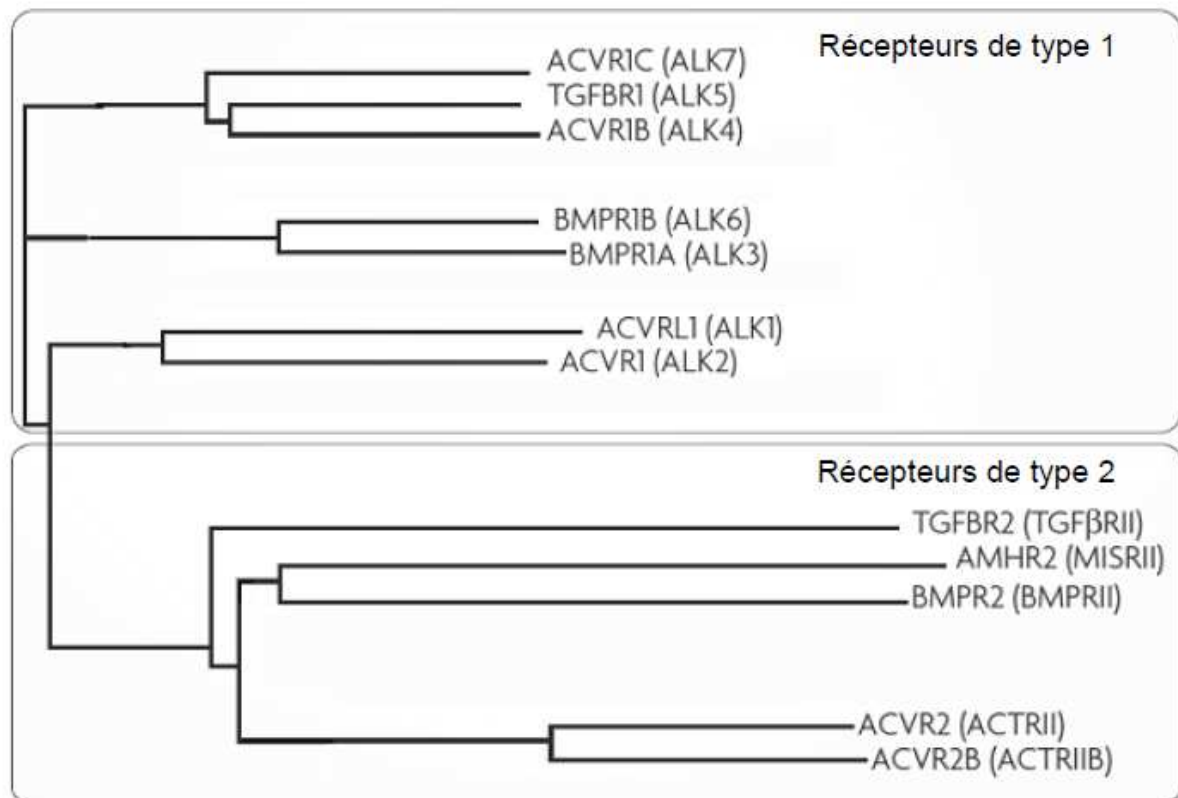


Figure 26 : Arbre phylogénétique des récepteurs de la famille TGF-β chez l'homme.
D'après (Schmierer B. 2007).

1.2 Les récepteurs de la famille TGF- β

1.2.1 *Bref historique*

Les premières recherches des récepteurs de cette famille ont été faites pour TGF- β 1 en utilisant du TGF- β 1 marqué à l'iode radioactif (^{125}I) (Frolik C. A. 1984) (Tucker R. F. 1984a). La découverte des récepteurs commença véritablement avec les travaux de Massagué. En effet, il montra l'existence de trois types de récepteurs de poids moléculaires très différents : un récepteur de type 1 de 65 kDa environ, un récepteur de type 2 de 85 kDa environ et enfin un récepteur de type 3 de très haut poids (> 200 kDa). Il décrit alors le récepteur de type 3 comme récepteur majoritaire au TGF- β (Massague J. 1985). Cependant, son équipe corrigea cette affirmation dès 1986 en montrant que certaines lignées cellulaires peuvent lier le TGF- β sans exprimer de récepteur de type 3 (Cheifetz S. 1986). Bien que les premières recherches se concentrèrent sur les récepteurs du TGF- β , le premier récepteur cloné fut un récepteur de l'activine, appelé maintenant ActR2 (Activin Receptor type 2). La connaissance de la séquence d'un récepteur de la famille TGF- β a permis d'émettre l'hypothèse de récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase pour cette famille (Mathews L. S. 1991). Les autres récepteurs ont alors été rapidement identifiés par homologie.

Ainsi, sept récepteurs de type 1, cinq récepteurs de type 2 et deux récepteurs de type 3 ont été identifiés chez les mammifères ([figure 26](#)). Les récepteurs de type 1 sont nommés ALK (Activin receptor-Like Kinase) 1 à 7. Les récepteurs de type 2 sont BMPR2 (BMP Receptor type 2), ActR2A et -B (Activin Receptor type 2 A et B), AMHR2 (AMH Receptor type 2), T β R2 (TGF- β Receptor type 2). Enfin l'endogline (Eng) et le bétaglycan sont les récepteurs de type 3 identifiés. Notons que les récepteurs de la famille du GDNF, famille la plus éloignée dans la superfamille du TGF- β , ont une activité tyrosine kinase et n'appartiennent donc pas au groupe énoncé précédemment. Je ne les présenterai donc pas dans ce manuscrit.

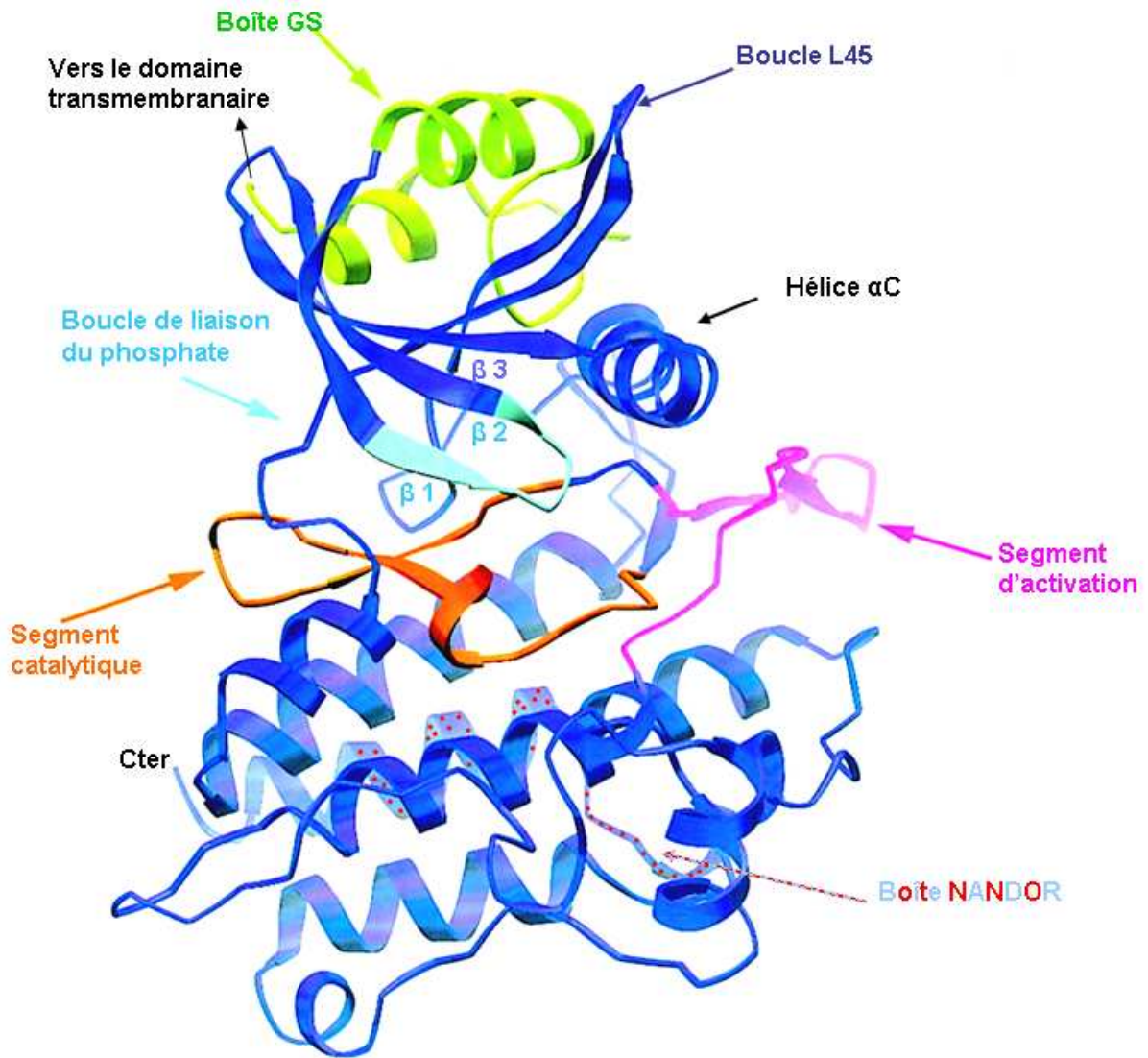


Figure 27 : Structure cristallographique du domaine kinase d'ALK5.

La boîte GS (en vert) est le domaine phosphorylé par le T β R2 pour activer ALK5.

La boucle L45 (en bleu) détermine la spécificité des Smads.

Le domaine de liaison du phosphate (en bleu clair) permet la liaison de l'ATP.

Le domaine catalytique (orange) est le siège de la réaction de phosphorylation des substrats.

Le domaine d'activation (en rose) bloque l'accès au site catalytique en l'absence d'activation du récepteur. La boîte GS est structurellement reliée au domaine d'activation par l'hélice α C.

La boîte NANDOR (en bleu à pois rouges) est un domaine très conservé dans les récepteurs de type 1 et dont le rôle est peu connu.

D'après (Huse M. 1999).

1.2.2 Structures des récepteurs

Les récepteurs de type 1 et 2 ont trois grands domaines : un domaine extracellulaire, un domaine membranaire et un domaine kinase intracellulaire. Les récepteurs de type 3 possèdent eux-aussi un domaine extracellulaire et membranaire, mais ne possèdent pas de domaine kinase, leur domaine intracellulaire étant très court. Je présenterai d'abord les structures des récepteurs de type 1 et de type 2, puis ensuite les structures des récepteurs de type 3.

Les récepteurs de type 1 et de type 2

Les récepteurs de types 1 et 2 sont des glycoprotéines de 50-60 kDa et 70-80 kDa respectivement.

Le domaine extracellulaire est du côté N-terminal de la séquence peptidique. La séquence signal, qui adresse la protéine à la membrane, est clivée lors de la maturation du récepteur. Ce domaine est N-glycosylé, et contient dix cystéines au moins qui déterminent la structure de ce domaine. Trois de ces cystéines forment une région caractéristique des récepteurs de cette famille appelée "boîte cystéine" et se trouvant près du domaine transmembranaire (Wrana J. L. 1994b).

Ces récepteurs possèdent une région transmembranaire unique sans particularité remarquable.

Le domaine intracellulaire peut se décomposer en 3 sous-domaines : la boîte GS, le domaine kinase, la queue cytoplasmique ([figure 27](#)).

La boîte GS est une caractéristique des récepteurs de type 1. Localisée juste avant le domaine kinase, c'est un domaine de 30 acides aminés très conservés. Cette région tient son nom de la séquence caractéristique qu'il contient (SGSGSG). Cette région contient les sites de phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2 (Wrana J. L. 1994a).

Le domaine kinase a une séquence canonique des serine/thréonine kinases (Mathews L. S. 1991). Ainsi, les structures des domaines kinases de ces récepteurs ont révélé la présence d'un feuillet $\beta 3$ impliqué dans la liaison avec l'ATP (Carcamo J. 1994) (Wrana J. L. 1992) et d'une boucle L45 dans les récepteurs de type 1 qui permet l'interaction avec les substrats (Feng X. H. 1997).

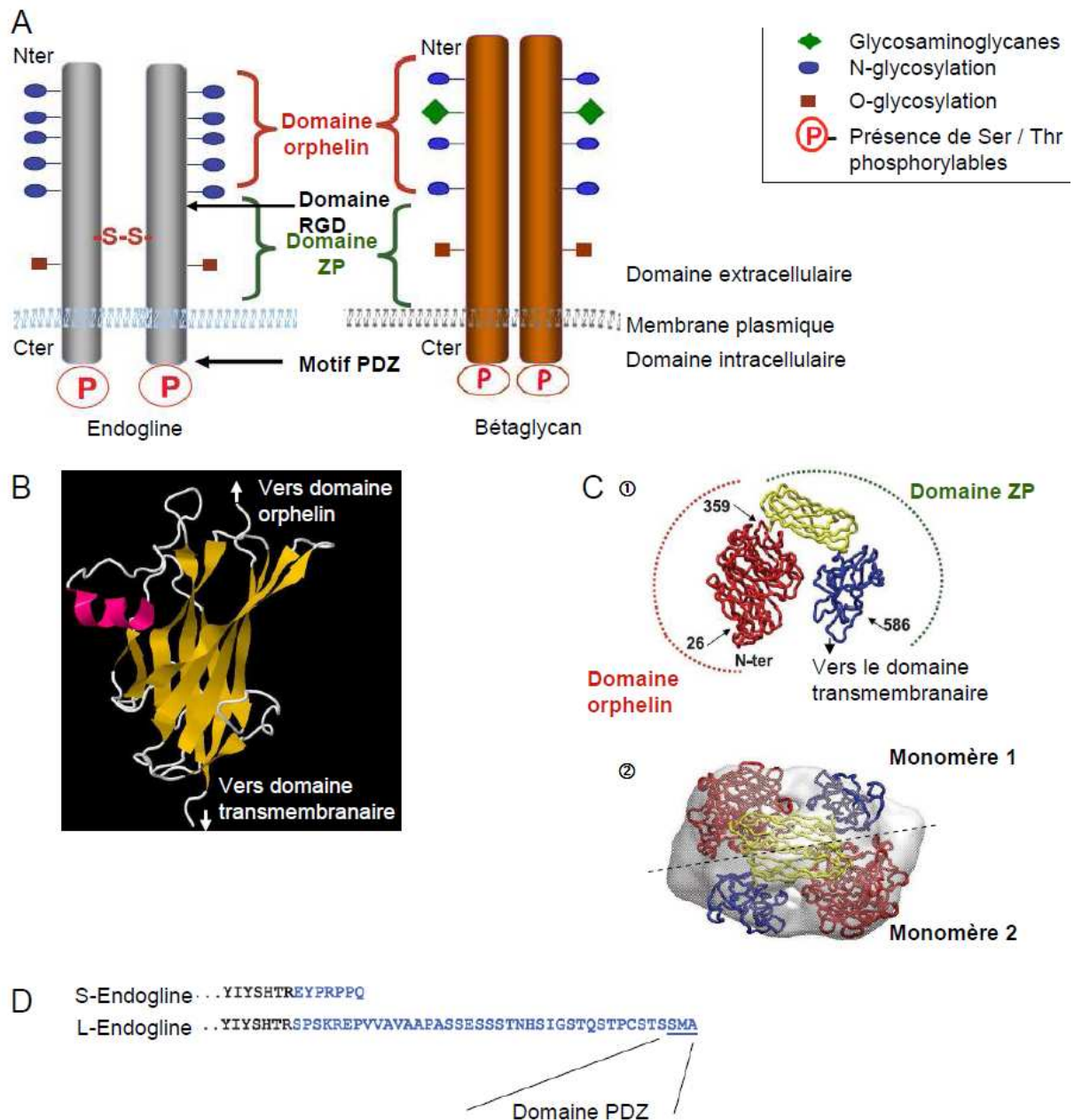


Figure 28 : Structure du bétaglycan et de l'endogline.

A : Représentation schématique des récepteurs. D'après (Lopez-Novoa J. M. 2010) et (Bernabeu C. 2009).

B : Structure cristallographique du domaine ZP du bétaglycan. D'après (Lin S. J. 2011).

C : Modèle prédictif de la structure du domaine extracellulaire de l'endogline à partir d'une microscopie électronique. ① Monomère "vu de côté". ② Organisation des domaines extracellulaires du dimère "vus du haut". D'après (Llorca O. 2007).

D : Séquences des domaines intracellulaires de l'endogline courte et longue. Les différences sont notées en bleu. Seule la forme longue possède le domaine PDZ. D'après (Lopez-Novoa J. M. 2010).

La queue cytoplasmique en C-terminal du domaine kinase est relativement courte pour les récepteurs de type 1 par rapport aux récepteurs de type 2. Cependant, une région très conservée entre les différents récepteurs de type 1 apparaît primordiale dans le fonctionnement de ces récepteurs. Cette région est appelée la boîte NANDOR (pour NonActivating Non-DOWn-Regulating). Elle se situe quelques acides aminés avant l'extrémité carboxyle du récepteur et comporte onze acides aminés. Cette région apparaît cruciale pour la régulation d'ALK5, mais n'interviendrait pas dans son activité kinase (Garamszegi N. 2001). Son rôle sera développé lors de la description de l'activation des récepteurs de type 1 par les récepteurs de type 2.

Les récepteurs de type 3

Le récepteur de type 3 du TGF- β est le bétaglycan. C'est un protéoglycan, avec un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique très court dépourvu d'activité kinase. Le domaine extracellulaire contient deux sites de fixation des glycosaminoglycanes, en plus de site de N- et O-glycosylation (Cheifetz S. 1988). Le bétaglycan apparaît comme un dimère non covalent (figure 28) (Henis Y. I. 1994).

Un autre récepteur de type 3 de la famille a été décrit chez les mammifères, il s'agit de l'endogline (ou CD105). Ce récepteur est une glycoprotéine très exprimée à la surface des cellules endothéliales (Gougos A. 1990). L'endogline se présente sous une forme dimérique (liaison covalente par au moins un pont disulfure) (figure 28). Comme le bétaglycan, l'endogline possède un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique sans activité kinase. L'endogline possède des sites de N- et O-glycosylation, mais ne possède pas de chaîne de glycosaminoglycanes. Le domaine extracellulaire de l'endogline présente un domaine RGD d'interaction avec les intégrines (domaine non conservé chez la souris, le porc et le rat) (Gougos A. 1990) (Yamashita H. 1994), un domaine zone pellucide (DZP) de 260 acides aminés (commun avec le bétaglycan) (Bork P. 1992), ainsi qu'un domaine orphelin sans homologie de structure connue (Gougos A. 1990). Le DZP est impliqué dans l'interaction de l'endogline avec les récepteurs au TGF- β en absence de celui-ci (Guerrero-Esteo M. 2002). Le domaine intracellulaire possède un motif d'interaction PDZ. De multiples sites de phosphorylation (résidus sérine/thréonine) sont présents (Koleva R. I. 2006). Je détaillerai les effets de ces phosphorylations lorsque je présenterai en détail la signalisation de l'endogline. Il existe deux isoformes d'endogline

consécutives à un épissage alternatif : une forme courte (S-endogline pour Short endogline) et une forme longue (L-endogline), différentes de 30 acides aminés dans le domaine intracellulaire (Bellon T. 1993). La L-endogline est la forme majoritaire, mais le ratio S/L entre ces deux formes peut changer, notamment lors du vieillissement des tissus ou lors de la sénescence des cellules endothéliales où ce ratio est augmenté (Blanco F. J. 2008).

Ces récepteurs modulent la liaison des ligands sur les récepteurs de type 1 et de type 2, sans posséder d'activité de transduction du signal propre. Ils sont donc souvent appelés co-récepteurs. Notons que le bétaglycan peut lier seul les trois isoformes du TGF- β (Lopez-Casillas F. 1993) alors que l'endogline ne peut lier que TGF- β 1 et TGF- β 3 en présence de T β R2 (Letamendia A. 1998).

2. Activation des voies de la famille TGF- β

La première étape dans la signalisation des ligands de la famille TGF- β est la liaison de ces derniers sur les récepteurs. Viennent ensuite l'intégration et la transduction du signal. Je vais donc décrire ces événements dans cette partie. La plupart des études ont été effectuées sur les récepteurs du TGF- β , mais les mécanismes d'activation peuvent être extrapolés aux autres récepteurs de la famille, dont ceux des BMPs.

2.1 Liaison du ligand sur les récepteurs

2.1.1 Etat basal des récepteurs

Les récepteurs de type 1, à l'image d'ALK5 récepteur de type 1 du TGF- β , ne sont pas phosphorylés en l'absence de ligand (Wrana J. L. 1994a). Par contre les récepteurs de type 2 sont phosphorylés. En effet, Wrana et collaborateurs ont montré, en cultivant des cellules exprimant le récepteur de type 2 au TGF- β (T β R2) avec du $^{32}\text{PO}_4$, que T β R2 était constitutivement actif et s'autophosphorylait (Wrana J. L. 1994a). L'étude des phosphorylations de T β R2 a permis de montrer que plusieurs sérines étaient phosphorylées avec des conséquences fonctionnelles différentes en fonction des sérines phosphorylées. Ainsi, les phosphorylations de la Ser213 (située dans la région proche de la membrane et en

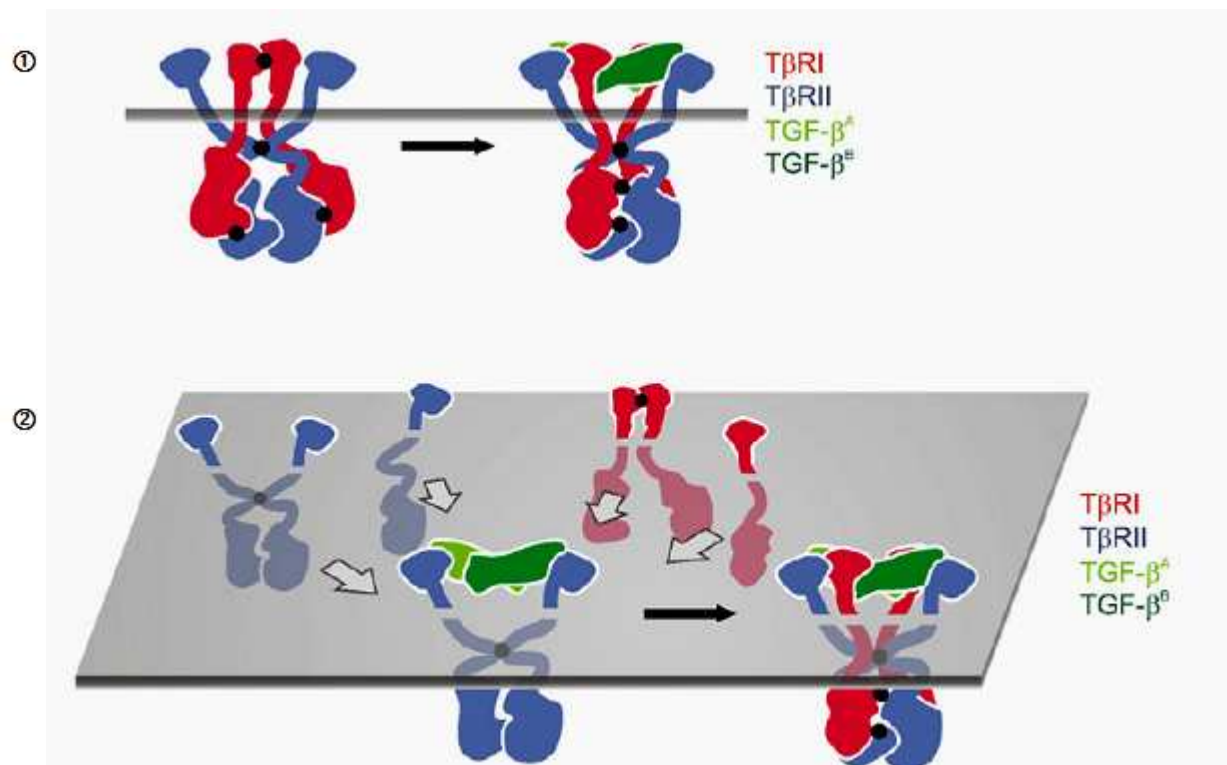


Figure 29 : Modes de formation des complexes de récepteurs.

① Formation du complexe de récepteurs avant la liaison du ligand (PFC). ② Formation du complexe de récepteurs par fixation du ligand (BISC). D'après (Ehrlich M. 2011).

dehors du domaine kinase) et de la Ser409 (située dans la région de reconnaissance du substrat) sont indispensables à l'activité kinase du récepteur de type 2. La Ser416 (située aussi dans la région de reconnaissance du substrat) peut être phosphorylée à la place de la Ser409, entraînant une perte de l'activité kinase de T β R2 (Luo K. 1997). Les auteurs ont utilisé une forme chimérique de T β R2, dont le domaine extracellulaire est celui du récepteur à l'érythropoïétine et le domaine intracellulaire est celui de T β R2. Ainsi, en l'absence du ligand (ici l'érythropoïétine), les récepteurs chimériques ne peuvent pas dimériser. Les auteurs ont ainsi montré que la phosphorylation de la Ser213 est intramoléculaire c'est-à-dire qu'un récepteur T β R2 phosphoryle sa propre Ser213, alors que les phosphorylations de la Ser409 et de la Ser416 apparaissent intermoléculaires, un récepteur T β R2 phosphorylant une des deux sérines de l'autre récepteur du dimère (Luo K. 1997). D'autres sites d'autophosphorylation ont été trouvés : la Tyr259, la Tyr336, et la Tyr424. Bien que les récepteurs de type 2 ont une activité sérine/thréonine kinase, T β R2 s'autophosphoryle sur ces trois tyrosines. La fonction des ces phosphorylations est peu claire (Lawler S. 1997).

En l'absence de ligand, T β R2 peut former des homodimères (Henis Y. I. 1994). Cette formation d'homodimère a été montrée aussi pour le récepteur de type 1 au TGF- β (ALK5) (Gilboa L. 1998), mais aussi pour des récepteurs aux BMPs (ALK3, ALK6 et BMPR2) (Gilboa L. 2000). Cette dimérisation a lieu dès le réticulum endoplasmique (Gilboa L. 1998).

Le groupe de P. Knaus a montré une particularité dans la dimérisation des récepteurs des BMPs (ALK3/ALK6 pour les types 1 et BMPR2 pour le type 2). En effet, leurs travaux montrent qu'une hétéro-oligomérisation sans ligand du récepteur de type 1 avec le récepteur de type 2 est possible et est latente (Gilboa L. 2000). Cette association récepteur de type 1/récepteur de type 2 a été montrée en très faible quantité pour TGF- β (complexe ALK5/T β R2) en l'absence de ligand (figure 29) (Wells R. G. 1999).

2.1.2 *Liaison du ligand sur les récepteurs*

La liaison du ligand sur les récepteurs induit la formation d'un hétérotétramère composé de deux récepteurs de type 1 et de deux récepteurs de type 2, chaque monomère du ligand liant un récepteur de chaque type (Wrana J. L. 1992). En ce qui concerne TGF- β , l'affinité pour le récepteur de type 2 est beaucoup plus importante que celle pour le récepteur de type 1. Ainsi TGF- β lie d'abord T β R2, et une fois le complexe TGF- β /T β R2 formé ALK5 est recruté (Wrana J. L. 1992). Il en est de même pour BMP7 (qui lie ActR2A et ActR2B

préférentiellement) (Greenwald J. 2003). Néanmoins, certains ligands de la famille ont une plus grande affinité pour les récepteurs de type 1 et se lie donc d'abord sur ce récepteur, comme BMP2 sur ALK3, BMP4 sur ALK6 (Koenig B. B. 1994) (Knaus P. 2001) ou encore BMP9 et BMP10 sur ALK1 (David L. 2007a).

La liaison des ligands sur les récepteurs apparait différente entre le groupe des TGF- β et la famille des BMPs.

Concernant les récepteurs du TGF- β , T β R1 (aussi appelé ALK5) et T β R2 apparaissent comme des homodimères préformés dans le réticulum endoplasmique. En l'absence de ligand il y a peu d'hétérodimère. Cette homodimérisation fait intervenir le domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire et l'arrangement dimérique ne semble pas altérer par la liaison du ligand (Gilboa L. 1998).

Une image différente est observée concernant la dimérisation des récepteurs des BMPs qui semble plus flexible et modulable par les ligands. Il existe à la surface des cellules de multiples formes de complexes de récepteurs préformés en l'absence de ligand. Certains complexes consistent en l'association de récepteurs de type 1 avec des récepteurs de type 2, comme BMPRII avec ALK3 ou ALK6 (Gilboa L. 2000). La sous-population de ces complexes dénommés PFC (PreFormed receptor Complexes) implique que le signal induit par le ligand soit modulé par un changement de conformation dans les sous-unités. Lors de la liaison du ligand, le niveau de complexes de récepteurs hétéromériques, employant donc des récepteurs de type 1 et de type 2, augmente significativement. Ainsi, deux modes de formation des complexes des récepteurs des BMPs semblent exister : le premier est ligand indépendant (PFC), et le second est induit par les BMPs (BISC pour BMP Induced Signaling Complexes). Une restriction de l'accessibilité des récepteurs peut être causée par la localisation au niveau de la membrane des assemblages de récepteurs. En effet, la signalisation par les BISC semble dépendante de l'association des récepteurs avec les radeaux lipidiques (ou caveolae), alors que la signalisation par les PFC est indépendante de l'association avec les radeaux lipidiques (Hartung A. 2006).

Il existe plusieurs modes de liaison des ligands sur les récepteurs. Deux sont d'intérêt pour les familles de ligand du TGF- β : le mode séquentiel et le mode coopératif. La liaison est dite séquentielle lorsque le ligand lie un site de haute affinité sur un type de récepteur et que le complexe formé recrute le second type de récepteur via un site de basse affinité. Le ligand ne peut pas alors se fixer sur le récepteur de basse affinité sans le récepteur de haute affinité. Le mode coopératif est caractérisé par une liaison du ligand sur un des deux types de

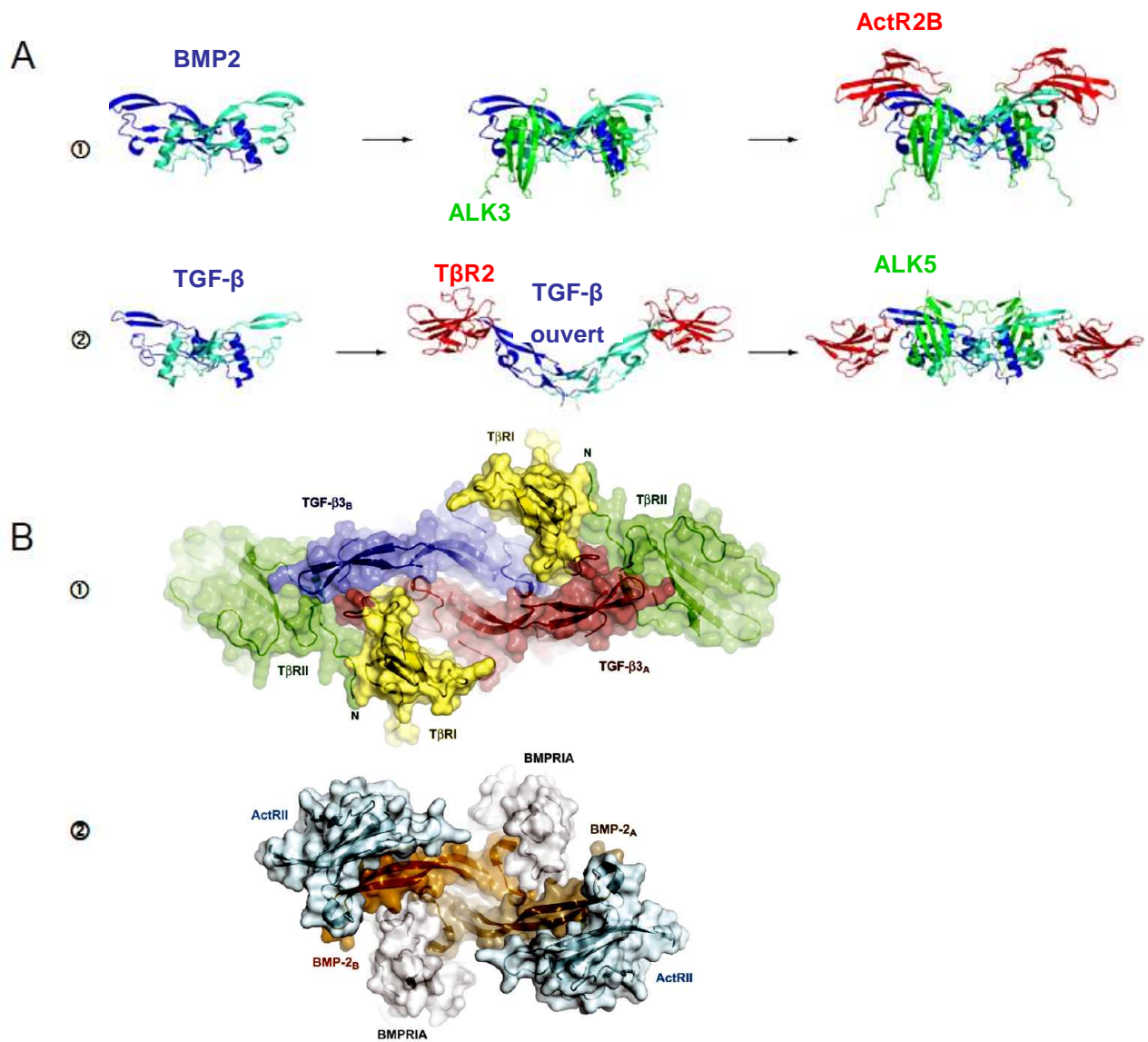


Figure 30 : Modes de liaison des ligands de la famille TGF- β .

A : ① BMP2 se lie d'abord sur les récepteurs de type 1 puis les récepteurs de type 2 sont recrutés. Aucun changement dans la structure du dimère de BMP2 n'est observé lors de la liaison. La liaison est donc séquentielle mais pas coopérative. ② TGF- β lie d'abord les récepteurs de type 2 au niveau des phalanges. La structure cristallographique du complexe révèle un changement dans la structure de TGF- β 3 lié aux récepteurs de type 2 avec une conformation ouverte. Les récepteurs de type 1 sont alors recrutés et le ligand retrouve sa conformation fermée initiale. La liaison est séquentielle et coopérative. D'après (Nickel J. 2009).

B : Complexe ternaire de TGF- β 3 et BMP2. ① T β R2 lie le bout des phalanges de TGF- β 3 et interagit avec ALK5. ② ActR2 lie BMP2 par sa face convexe et n'interagit pas avec ALK3. D'après (Groppe J. 2008).

récepteurs avec une augmentation de la liaison lorsque les deux récepteurs sont coexprimés (Nickel J. 2009). Ces deux modes ne sont pas exclusifs. Concernant les TGF- β 1 et 3 ainsi que les activines, un site de haute affinité sur le récepteur de type 2 est impliqué dans la liaison. Le récepteur de type 1 est alors recruté par le complexe ligand-récepteur de type 2 (figure 30A) (Zuniga J. E. 2005) (Attisano L. 1996). Ainsi TGF- β 1 et 3 et les activines lient leur récepteur dans un mode séquentiel. Les changements conformationnels induits par le récepteur de type 2 et les contacts entre le récepteur de type 1 et le récepteur de type 2 résultent en une augmentation de 60 fois de l'affinité de TGF- β 3 pour T β R1 en présence de T β R2 (Groppe J. 2008). Ainsi TGF- β 1 et 3 lient aussi leurs récepteurs selon un mode coopératif (figure 30A). Pour les BMPs, l'étude de formation des BISC avec BMP2 montre que BMP2 lie avec une grande affinité ALK3 ou ALK6, et avec une faible affinité les récepteurs de type 2 (Kirsch T. 2000a). Cette différence d'affinité s'explique par une cinétique de liaison différente, l'association de BMP2 avec les récepteurs de type 1 étant plus stable (dissociation plus longue) que la liaison de BMP2 sur les récepteurs de type 2. Par contre les tests de liaison au BIAcore montre que l'affinité de liaison de BMP2 pour ActR2B est indépendante de la présence du récepteur de type 1. Ceci indique l'absence de contacts favorables énergétiquement entre les domaines extracellulaires de deux récepteurs et l'absence de changement de conformation induite par le récepteur de type 1 sur l'épitope de liaison du récepteur de type 2. Ceci fut vérifié par la réalisation des complexes ternaires (figure 30A) (Allendorph G. P. 2006) (Weber D. 2007). De plus, des tests de liaison de radioligands ont montré que la liaison de BMP2 sur ALK3 n'est pas augmentée par la cotransfection des récepteurs de type 2 (Heinecke K. 2009). Tout ceci prouve que BMP2 lie les récepteurs selon le mode séquentiel mais pas coopératif (Nickel J. 2009).

Par extension, la liaison des BMPs est considérée comme séquentielle et non coopérative, alors que la liaison des TGF- β est séquentielle et coopérative. Notons juste que TGF- β 2 ne lie ni T β R1, ni T β R2 en l'absence de betaglycan. Mais une fois fixé par le betaglycan, TGF- β 2 lie avec une grande affinité T β R2 puis recrute ensuite T β R1 comme les autres isoformes du TGF- β (Zuniga J. E. 2005).

Cette différence du mode de liaison peut être expliquée par des conformations lors des associations ligand/récepteurs différentes. La cristallisation des complexes tertiaires a permis de mettre en lumière ces différences. En effet, des études de mutagenèse ont montré que, pour les BMPs, l'épitope de liaison des récepteurs de type 1 est localisé dans le site concave formé par l'hélice α d'un monomère et la partie concave du feuillet β de l'autre monomère (figure 30B). En reprenant le modèle de la "main gauche", ce site est le "poignet". Le site de liaison

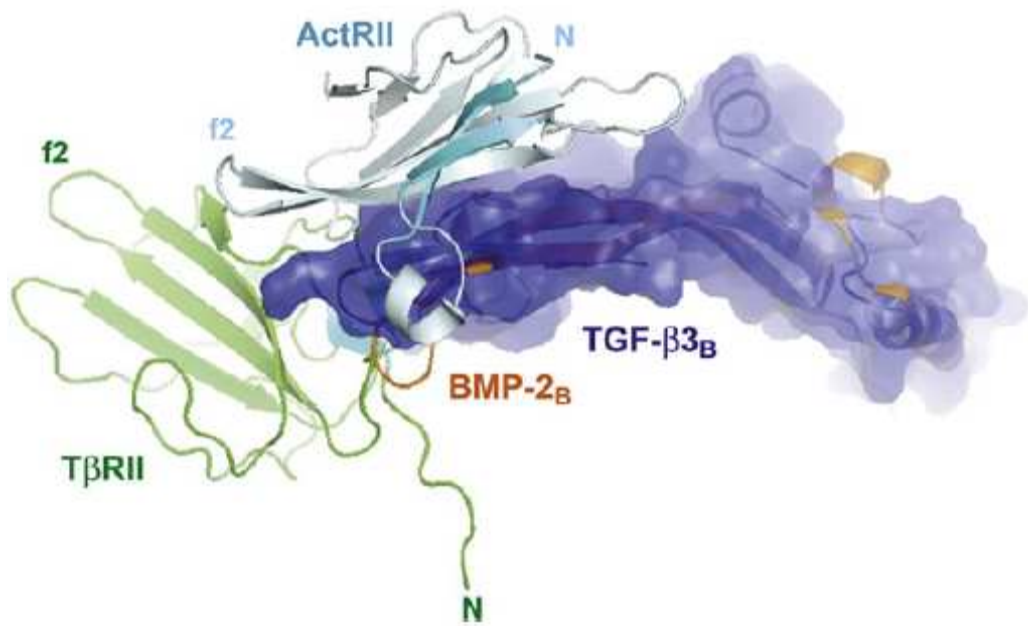


Figure 31 : Modes de liaison des récepteurs de type 2.

Superposition de monomères de TGF- β et de BMP2 liés à leur récepteur de type 2. Les localisations des épitopes de liaison de ces récepteurs sur leur ligand sont très différentes, ActR2 liant la face convexe de BMP2 et T β R2 le bout des phalanges de TGF- β . D'après (Groppe J. 2008).

du récepteur de type 2 est localisé sur le côté convexe des deux doigts, ou "phalanges" (Kirsch T. 2000b). Par contre, T β R2 lie le bout des doigts du TGF- β , malgré la conservation des résidus constituant les phalanges entre TGF- β et les BMPs (figure 30B et figure 31) (Hart P. J. 2002). L'épitope de liaison de T β R2 est aussi différent de celui de BMPR2 et ActR2A et B, le feuillet β 2' de T β R2 s'intercalant entre les doigts du TGF- β alors que les feuillets β 3,4 et 6 de ActR2B rentre en interaction avec BMP2 (Allendorph G. P. 2006) (Weber D. 2007) (Hart P. J. 2002).

En plus des différences de localisation des épitopes, les structures d'activine-A (Greenwald J. 2004) (Thompson T. B. 2003) (Harrison C. A. 2004) et de TGF- β 3 (Hart P. J. 2002) libres ou liés au récepteur de type 2 montrent que les dimères des ligands peuvent prendre une conformation ouverte une fois liés aux récepteurs de type 2 (figure 30A). Une telle conformation n'a jamais été observée pour les BMPs. Le recrutement du récepteur de type 1 serait facilité par cette conformation ouverte en augmentant l'accessibilité de l'épitope de liaison du récepteur de type 1 sur les ligands et sur le récepteur de type 2. Les ligands reprennent une conformation fermée dans le complexe ternaire (figure 30A) (Groppe J. 2008).

Pour résumer, les BMPs lient le récepteur de plus haute affinité puis recrute le récepteur de plus faible affinité, sans changement de conformation ni interaction entre les deux types de récepteur. Le mode de liaison est donc séquentiel mais non coopératif. TGF- β et les activines lient les récepteurs de type 2, ce qui entraînent un changement de conformation et permet un recrutement des récepteurs de type 1 qui interagissent avec les ligands et les récepteurs de type 2. Le mode de liaison est donc séquentiel et coopératif. Les sites de liaison des récepteurs de type 2 sont différents entre les TGF- β et les BMPs. Bien que le mode de liaison des activines soit équivalent à celui des TGF- β , les épitopes de liaison des récepteurs de type 2 des activines sont comparables à ceux sur les BMPs et non sur les TGF- β (Nickel J. 2009).

Ces modes de liaison expliquent la spécificité de liaison des ligands sur certains récepteurs. Ainsi, certaines interactions entre un ligand et des récepteurs ont été tranchées par les structures des complexes. Par exemple, ALK1 a été décrit comme un récepteur de TGF- β 1 dans un hétérocomplexe de récepteurs de type 1 : ALK1 – ALK5 (Goumans M. J. 2003). Cependant, la structure du complexe ternaire du TGF- β et l'analyse des séquences d'ALK1 et d'ALK5 dans les zones de liaison au ligand montrent que les interactions responsables de la liaison d'ALK1 sont différentes de celles recrutant ALK5. En effet, l'élément principal nécessaire à la liaison du récepteur de type 1 sur le complexe TGF- β /T β R2 est une extension

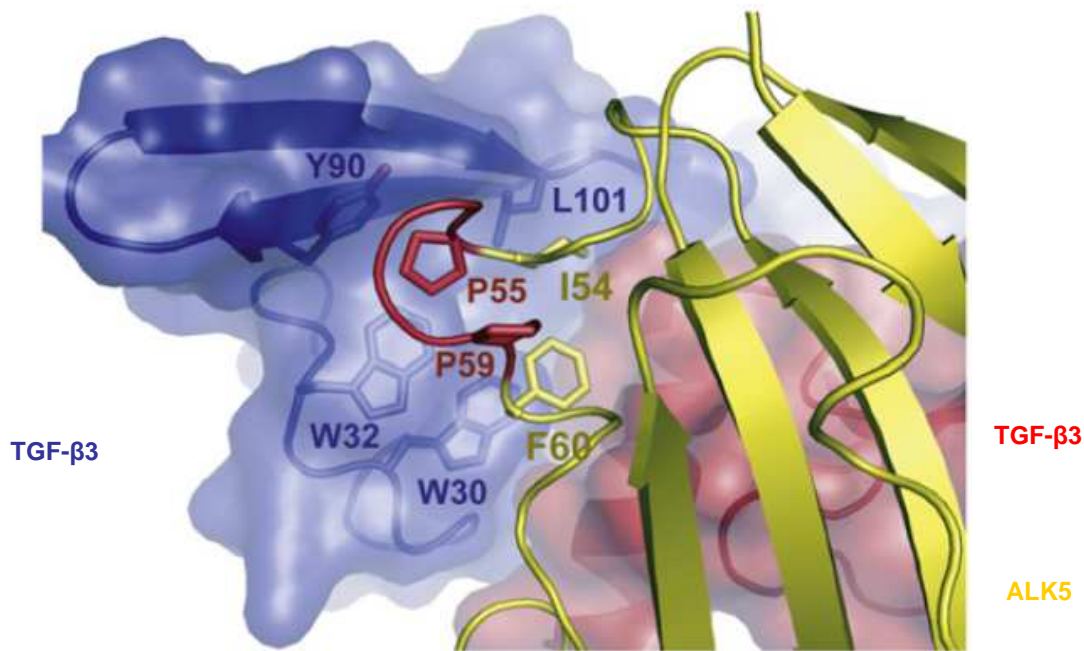
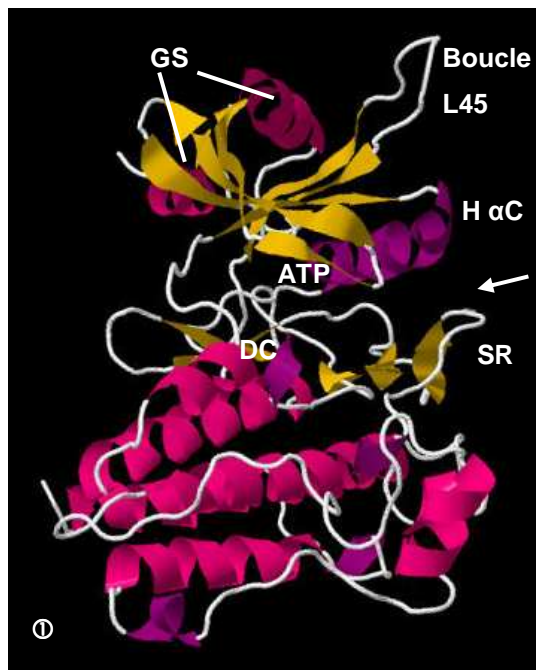
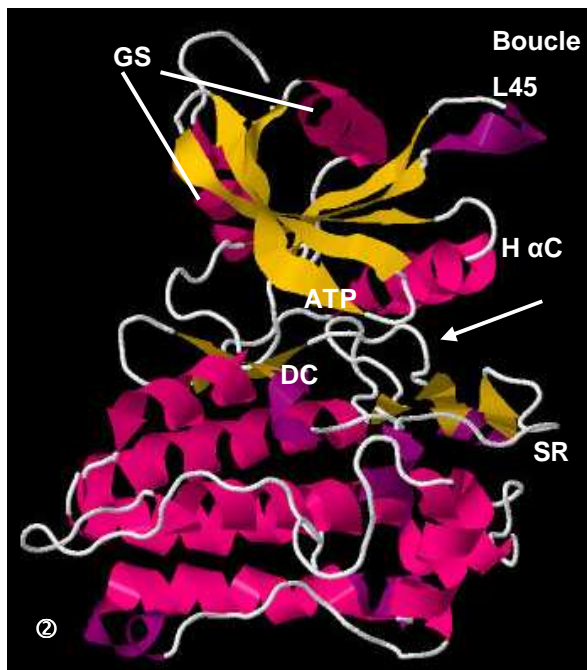


Figure 32 : Extension préhélice caractéristique d'ALK5.

L'extension préhélice (en rouge sur ALK5) lie les longs doigts du monomère bleu de TGF- β 3. Cette extension est absente sur les récepteurs des BMPs comme ALK1. D'après (Groppe J. 2008).



Domaine kinase d'ALK5 inactif



Domaine kinase d'ALK5 actif

Figure 33 : Comparaison des structures cristallographiques d'ALK5 inactif et actif.

GS : Boîte GS, H α C : Hélice α C, SR : Segment de Régulation, DC : Domaine Catalytique, ATP : Domaine de liaison de l'ATP, flèche : entrée du domaine catalytique.

① A l'état inactif l'entrée du domaine catalytique est fermée par le SR. ② Après phosphorylation de la boîte GS, un changement de conformation impliquant la boucle L45 et l'hélice α G entraîne un déplacement du SR qui ouvre alors le domaine catalytique. L'ATP peut se fixer ainsi que les substrats. D'après (Huse M. 1999) et (Huse M. 2001).

préhélice (figure 32). Cette extension est absente sur les récepteurs de type 1 des BMPs, comme ALK1, ce qui empêche ALK1 de lier TGF- β de manière similaire à ALK5. De plus, TGF- β ne possède pas la boucle préhélice des BMPs nécessaire à la liaison des BMPs sur les récepteurs de type 1. Ainsi, ALK1 ne peut pas lier TGF- β selon le modèle de liaison des BMPs. De ce fait, le modèle de l'hétérocomplexe ALK1/ALK5 liant TGF- β n'est plus concevable avec les connaissances actuelles (Groppe J. 2008).

Notons enfin que les concentrations effectives à 50 % de la réponse maximale (EC_{50}) sont un reflet de la liaison des ligands sur les récepteurs. Ainsi, le fait que BMP2 se lie longuement sur son récepteur de type 1 mais brièvement sur son récepteur de type 2 entraîne une faible activation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2. Ainsi, l' EC_{50} des actions de BMP2 est relativement élevé (Nickel J. 2009). En effet, l' EC_{50} des effets de BMP2 sur plusieurs types cellulaires pour différentes réponses a été mesuré entre 20 ng/mL et 50 ng/mL (Marrony S. 2003) (Rudkin G. H. 1996) (Willette R. N. 1999). Par contre, TGF- β et les activines lient avec une forte affinité le récepteur de type 2 ce qui permet l'activation de nombreux récepteurs de type 1, même si l'affinité pour ceux-ci reste assez faible. D'ailleurs, les EC_{50} de ces ligands sont beaucoup plus faibles (Nickel J. 2009), de l'ordre de 2 ng/mL pour TGF- β (Rudkin G. H. 1996) et 3.5 ng/mL pour les activines (Ling N. 1986b). L' EC_{50} de BMP9 sur ALK1 a été décrit à 45 pg/mL, ce qui est particulièrement faible (David L. 2007a). Un mode de liaison particulier entre BMP9 et ALK1 est alors envisageable et mérite d'être étudié.

La formation de l'hétérotétramère lors de la liaison du ligand permet l'activation du récepteur de type 1 et la transduction du signal.

2.1.3 Etat activé des récepteurs

La formation du complexe induit par le ligand aboutit rapidement à la phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2, ce qui a été démontré en premier pour TGF- β (Wrana J. L. 1994a). Les auteurs ont aussi montré les sites de phosphorylation, à savoir les sérines et les thréonines de la boîte GS (Thr185, Thr186, Ser187, Ser189, Ser191). La phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2 entraîne un changement de conformation ouvrant le boucle L45 ce qui rend le site catalytique accessible aux substrats ainsi qu'à l'ATP (figure 33) (Huse M. 2001). Notons qu'une mutation ponctuelle dans la

boîte GS, par exemple T204D pour ALK5, entraîne l'apparition d'une charge négative (l'acide aspartique) à la place d'un acide aminé neutre (la tyrosine). Cette charge négative mime la phosphorylation du récepteur de type 1 sur sa boîte GS et aboutit à un récepteur constitutivement actif, c'est-à-dire dont l'activité ne dépend pas de la présence du ligand ou de l'activité kinase du récepteur de type 2 (Wieser R. 1995). La boîte NANDOR, domaine de onze acides aminés très conservé dans la partie C-terminale des récepteurs de type 1 apparaît comme régulatrice de l'activation du récepteur ALK5 par T β R2. En effet, la mutation de l'ensemble des acides aminés de ce domaine aboutit à un récepteur non phosphorylable par T β R2 (Garamszegi N. 2001).

Après l'activation des récepteurs de type 1 par phosphorylation de leur boîte GS par les récepteurs de type 2, la transduction du signal peut alors commencer.

2.2 Intégration du signal par endocytose des récepteurs

Une étape importante dans la transduction du signal est l'endocytose des récepteurs. Les récepteurs de la famille TGF- β subissent une endocytose après liaison du ligand et formation de l'hétérotétramère. Cette internalisation peut se faire selon deux modes : l'endocytose par les puits de clathrine ou l'endocytose par les cavéoles (Di Guglielmo G. M. 2003) (Hartung A. 2006).

La clathrine est une protéine cytoplasmique recrutée au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique où elle induit la formation de puits d'internalisation, en partenariat avec la dynamine. La protéine AP2 (Adaptator Protein 2) lie la clathrine et participe à l'endocytose. Les vésicules internalisées perdent alors leur enveloppe de clathrine et deviennent des endosomes précoces (Le Roy C. 2005). Un marquage des récepteurs du TGF- β ou du TGF- β lui-même montre une colocalisation avec EEA1 (Early Endosome Antigen 1), un marqueur des endosomes précoces (Di Guglielmo G. M. 2003).

Le second type d'endocytose est celui par les radeaux lipidiques, et plus précisément par les cavéoles, invagination de la membrane plasmique au niveau d'un radeau lipidique. Ces invaginations contiennent des sphingolipides, du cholestérol, et des cavéolines (principalement la cavéoline-1). Wrana et collaborateurs ont montré que la cavéoline-1 colocalise avec les récepteurs au TGF- β (Di Guglielmo G. M. 2003).

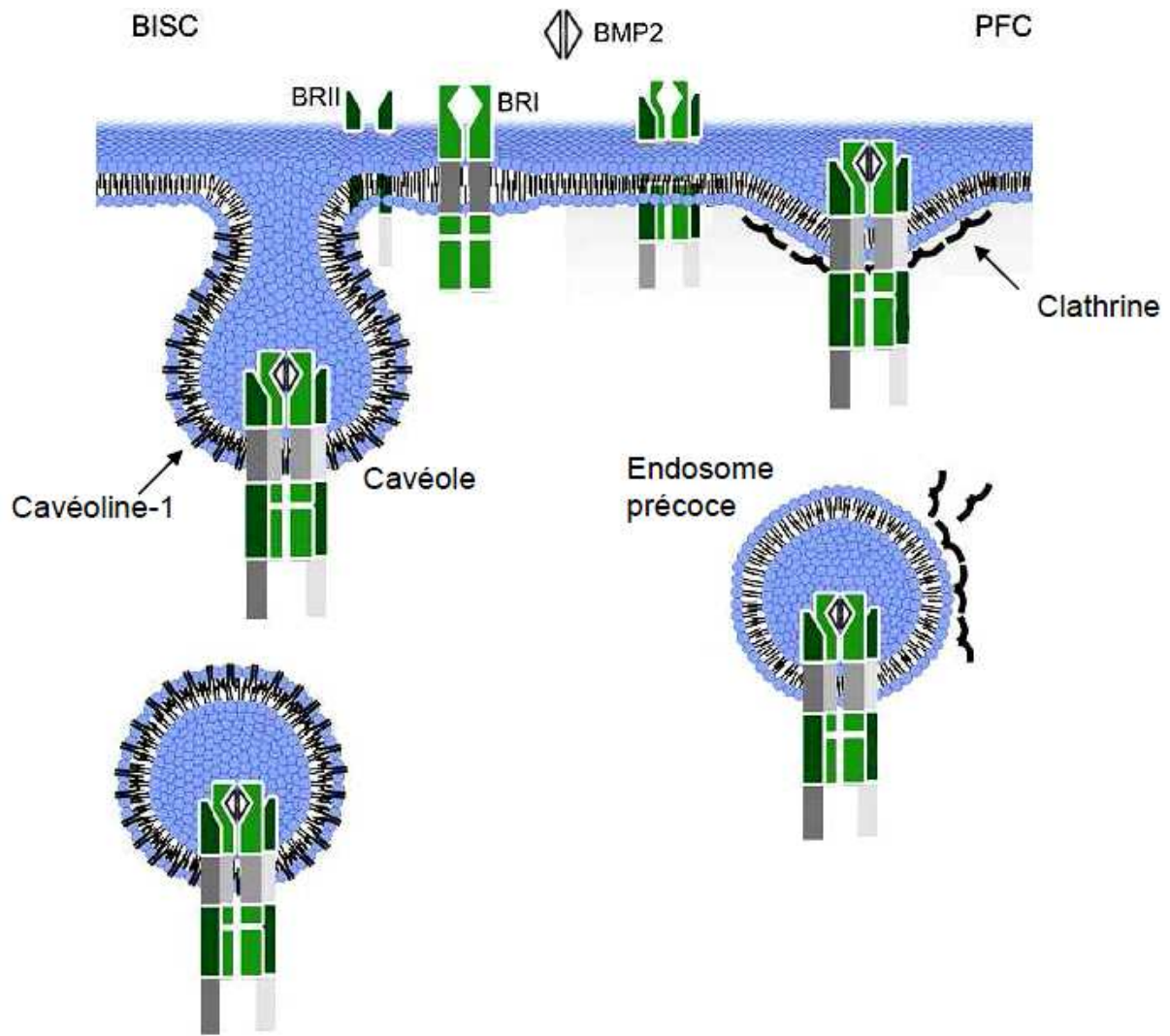


Figure 34 : Schématisation simplifiée des modes d'endocytose des récepteurs des BMPs.
 A gauche, les complexes de récepteurs formés par la liaison du ligand (BISC) sont dans les radeaux lipidiques et subissent une endocytose par cavéole. A droite, les complexes de récepteurs sont formés avant la liaison du ligand (PFC) et sont internalisés par puits de clathrine.

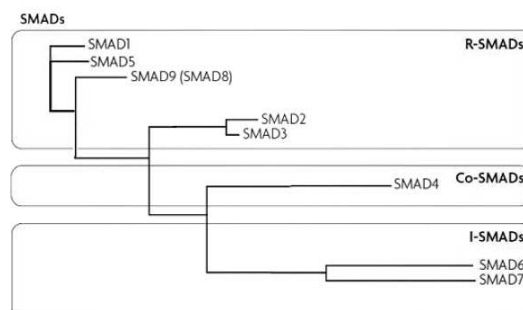


Figure 35 : Arbre phylogénétique des Smads de la famille TGF- β chez l'homme.
 D'après (Schmierer B. 2007).

Ainsi, deux modes d'endocytose différents permettent l'internalisation des récepteurs au TGF- β . Il en va de même pour les récepteurs aux BMPs comme l'a montré le groupe de P. Knaus. En effet, ce groupe a découvert une colocalisation et une interaction directe entre cavéoline-1 et les récepteurs de BMP2, mais aussi entre Eps15R (une protéine présente dans les puits de clathrine) et les récepteurs de BMP2 (Hartung A. 2006). Dans ce même article, les auteurs montrent que les hétérotétramères préformés avant la liaison du ligand (PFC) seraient présents dans les puits de clathrine, tandis que les hétérotétramères formés lors de la liaison du ligand (BISC) seraient dans les radeaux lipidiques (figure 34).

Le mode d'endocytose des récepteurs a une conséquence directe sur la voie de signalisation et la dégradation des récepteurs. Je vais exposer à présent ces voies de signalisation.

2.3 Les voies de signalisation

La voie de signalisation spécifique de la famille TGF- β est la voie Smad. Je vais présenter en premier lieu cette voie de signalisation. Les voies moins spécifiques, comme celles des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), seront présentées dans un second temps.

2.3.1 La voie de signalisation Smad

Le membre fondateur de la famille des Smads est le gène *Mad* (pour Mothers Against *dpp*) de *Drosophila* (Sekelsky J. J. 1995). Le nom de ce gène a été donné par les auteurs qui ont montré que des mutations du gène *Mad* chez la mère induisaient une perte de l'activité de *dpp* (decapentaplegic) dans l'embryon, un analogue de BMP2 et BMP4 chez la drosophile. Trois homologues de *Mad* ont été trouvés chez *C. elegans* et dénommés *sma* (*sma*2/3/4) car des mutations dans ces gènes donnent des corps de petites tailles ("small") (Savage C. 1996). Les gènes des mammifères furent ensuite décrits et dénommés *Smad* (condensé de *Sma* et *Mad*). Une des premières Smad humaines identifiées fut Smad4, connue alors sous le nom DPC4 pour Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4 (Hahn S. A. 1996). Smad1 fut aussi rapidement identifiée (Liu F. 1996). Aujourd'hui huit membres de la famille Smad sont

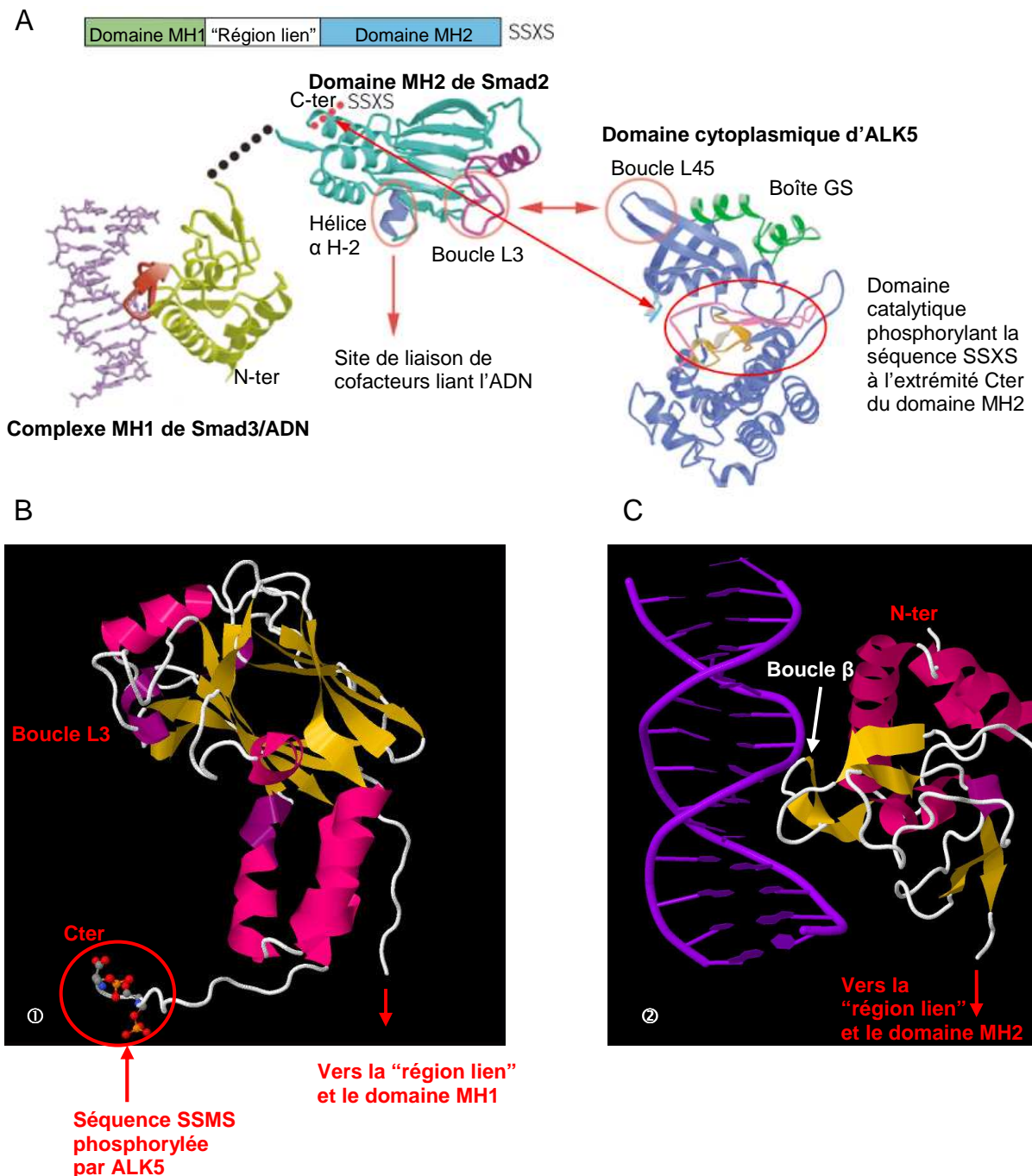


Figure 36 : Structure des R-Smads

A : ① Représentation schématique des différents domaines de R-Smads. ② Structure cristallographique du domaine MH1 de Smad3 lié à l'ADN et structure cristallographique du domaine MH2 de Smad2 montrant les interactions entre ce domaine et le domaine kinase d'ALK5. La boucle L45 d'ALK5 et la boucle L3 du domaine MH2 assurent la spécificité des R-Smads phosphorylés par le récepteur de type 1. D'après (Massague J. 2000).

B : Structure cristallographique du domaine MH2 de Smad2. La séquence SSMS à proximité de l'extrémité C-terminale est phosphorylée par ALK5, ce qui active la voie Smad. D'après (Wu J. W. 2001)

C : Structure cristallographique du domaine MH1 de Smad3 lié à l'ADN. D'après (Shi Y. 1998).

identifiés dans les génomes humain et murin (figure 35), quatre chez *Drosophila*, et trois chez *C. elegans* (Massague J. 1998). En fonction de leur rôle dans la signalisation, les Smads humaines sont classées en trois groupes : les R-Smad (Receptor-regulated Smads) qui comptent Smad1/2/3/5/8, les Smads inhibitrices : Smad6/7, et un partenaire commun aux différentes R-Smads appelé Co-Smad ou Smad4. Je vais dans un premier temps décrire la transduction du signal via les R-Smads et Smad4. La régulation de l'activité par les Smads inhibitrices sera décrite ultérieurement.

Structure des Smads

Les Smads se présentent sous la forme de deux domaines globulaires conservés (domaines MH1 et MH2 pour Mad-Homology), liés entre eux par une "région lien" ou linker (figure 36A). Le domaine MH1 est présent dans les R-Smads et Smad4 uniquement, du côté N-terminal. Il contient le domaine de liaison des Smads à l'ADN (figure 36) (Shi Y. 1998). Lors de la cristallographie du domaine MH1 de Smad3 en liaison avec de l'ADN, les auteurs ont mis en évidence un nouveau mode d'interaction protéine/ADN. En effet, le domaine MH1 se lie à l'ADN via une boucle β (c'est-à-dire deux feuillets β antiparallèles séparés par une boucle de liaison), et non via un mode de liaison plus classique (doigt de zinc, leucine zipper, homéodomaine,...) (figure 36B). Cette structure a été affinée quelques années après par Chai et collaborateurs. Ils ont alors montré que le domaine MH1 contient un atome de zinc fortement lié (Chai J. 2003). Notons que le variant le plus abondant de Smad2 ne peut pas lier l'ADN à cause d'une insertion à proximité de la boucle β (Shi Y. 1998) (Yagi K. 1999). A l'état basal, le domaine MH1 interagit avec le domaine MH2 (Hata A. 1997), bloquant la liaison à l'ADN (Kim J. 1997), et inhibant les effets transcriptionnels de MH2 (Liu F. 1996). Enfin, ce domaine porte une séquence d'importation nucléaire, que ce soit pour les R-Smads (Xiao Z. 2000a) ou Smad4 (Xiao Z. 2003b).

Le domaine MH2 est très conservé pour l'ensemble des huit Smads, côté C-terminal. Ce domaine permet l'interaction des Smads avec de nombreuses protéines. Les Smads peuvent former des oligomères via des interactions par leur domaine MH2 (Lagna G. 1996) (Hata A. 1997) (Hata A. 1998) (Wu R. Y. 1997) (Shi Y. 1997). Les R-Smads peuvent s'associer aux récepteurs de type 1 (Macias-Silva M. 1996), avec Smad4 après phosphorylation (Hata A. 1997), ainsi qu'avec des facteurs de transcription (Liu F. 1997)

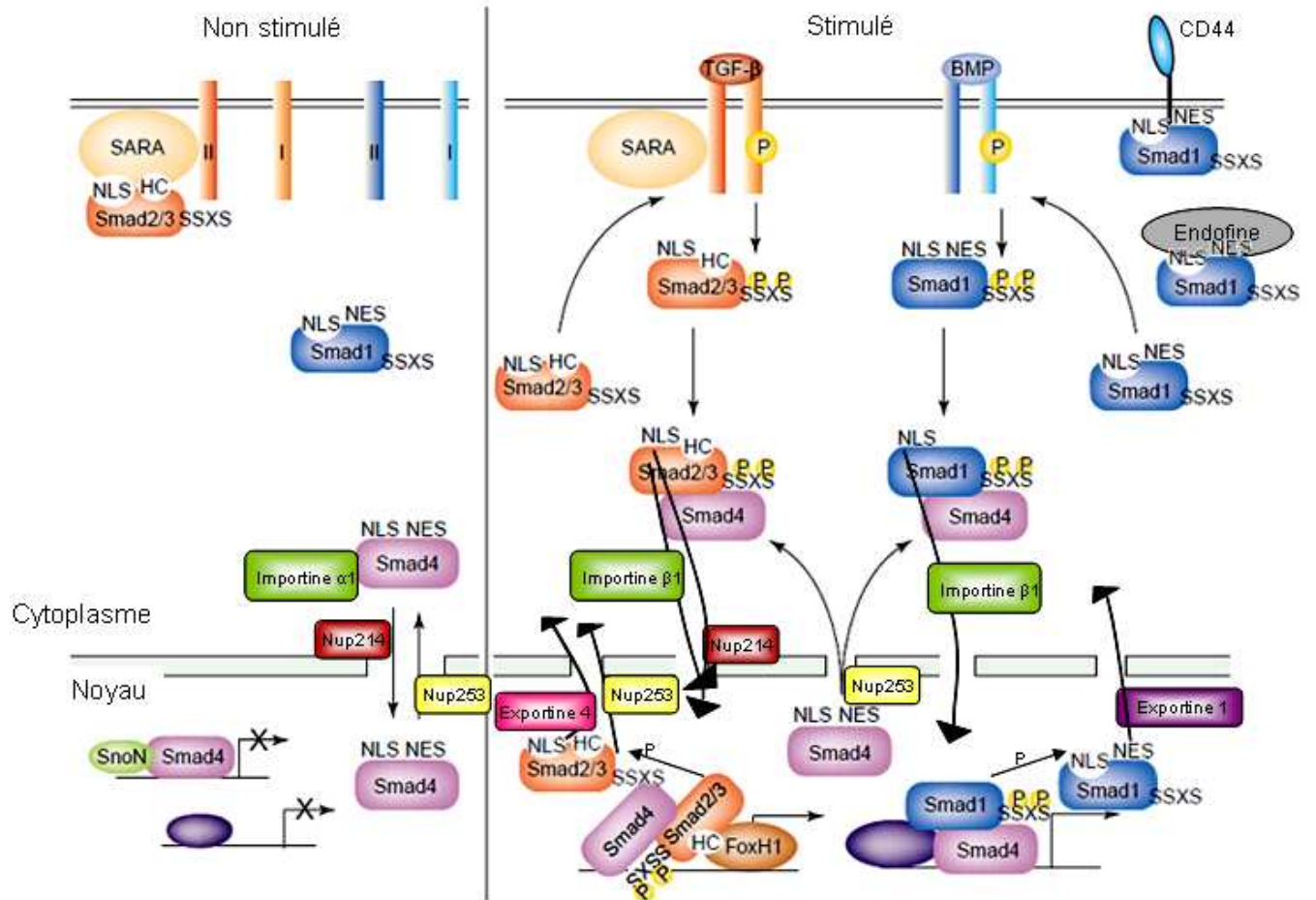


Figure 37 : Transports des Smads Noyau/Cytoplasme.

HC : Séquence hydrophobe (Hydrophobic Corridor), NLS : Séquence d'importation nucléaire, NES : Séquence d'exportation cytoplasmique, NUP : Pore nucléaire (Nuclear Pore), P : Phosphatase.

La séquence HC permet à Smad2/3 de s'ancrer à SARA. CD44 et Endofine lient Smad1 et participent à sa rétention cytoplasmique, en l'absence de phosphorylation. D'après (Reguly T. 2003).

(Chen X. 1997). Les R-Smads possèdent à l'extrémité C-terminale de ce domaine un motif SXS qui est phosphorylé lors de l'activation des Smads (figure 36) (Abdollah S. 1997) (Souchelnytskyi S. 1997). Le domaine MH2 joue aussi un rôle dans l'adressage vers le noyau des Smads en liant directement des nucléoporines (Xu L. 2002), mais interagit aussi avec des protéines qui assurent la rétention cytoplasmique de ces Smads (Wu G. 2000). Je décrirai plus tard les mécanismes de transport des Smads entre le noyau et le cytoplasme.

Le linker, région qui relie les domaines MH1 et MH2, est peu conservé entre les Smads. Cette région contient des sites de phosphorylation notamment pour les MAPKs (Kretzschmar M. 1999), ainsi qu'un motif PY qui permet des interactions avec les Smurfs (Smad Ubiquitin Regulatory Factors), E3 ubiquitine ligase spécifique des Smads (Zhu H. 1999).

Etat basal des R-Smads et de Smad4

La distribution ainsi que les complexations des Smads sont très différentes entre l'état basal (= non phosphorylé) des R-Smads et l'état activé de ces R-Smads.

La localisation subcellulaire des R-Smads à l'état basal est principalement cytoplasmique, mais cette distribution est dynamique avec des échanges constants entre le noyau et le cytoplasme (Inman G. J. 2002b). Cette distribution est assurée par une exportation des R-Smads du noyau vers le cytoplasme plus rapide que l'importation de ces R-Smads du cytoplasme vers le noyau (Schmierer B. 2005). Les mécanismes permettant le transport des R-Smads au travers de la membrane nucléaire sont nombreux, complexes et pas encore totalement élucidés. Les R-Smads les plus étudiées sont Smad2 et Smad3 (les R-Smads de la voie du TGF- β). Deux types d'importation des Smad2/3 du cytoplasme vers le noyau ont été décrits. Un premier mécanisme fait intervenir l'importine β 1 par interaction avec une séquence NLS (Nuclear Localising Sequence) présente dans le domaine MH1 (figure 37) (Xiao Z. 2000b) (Xiao Z. 2000a). La séquence NLS de Smad2 est inactive dans le transcript le plus courant (Reguly T. 2003). Un second mécanisme fait état d'une interaction directe entre le domaine MH-2 de Smad2/3 et les nucléoporines situés du côté cytoplasmique CAN/Nup214 (figure 37) (Xu L. 2002) (Xu L. 2003). Concernant Smad1, seul le mécanisme faisant intervenir l'importine- β 1 sur la séquence NLS a été décrit (figure 37) (Xiao Z. 2001). Les exportations des R-Smads du noyau vers le cytoplasme font aussi intervenir différents

processus. Deux séquences NES (Nuclear Export Sequence) ont été décrites pour Smad1 (une sur MH-1 et une sur MH-2). Les deux séquences permettent une exportation dépendante de CRM-1 (Chromosome Region Maintenance 1 ou exportine-1) (figure 37) (Xiao Z. 2001) (Xiao Z. 2003a). Ces régions NES sont conservées dans les autres R-Smads, mais non fonctionnelles chez Smad2/3 (Pierreux C. E. 2000) (Xu L. 2002) (Inman G. J. 2002b) (Chen H. B. 2005). Ces dernières peuvent être exportées soit par interaction directe avec la nucléoporine du côté nucléaire Nup153 (Xu L. 2002), soit par interaction avec l'exportine-4 (interaction prouvée pour Smad3 et suspectée pour Smad2) (figure 37) (Kurisaki A. 2006).

En l'absence de ligand, Smad4 est distribuée de manière équivalente dans le noyau et le cytoplasme (Pierreux C. E. 2000). Cet équilibre est atteint grâce à une vitesse d'exportation et d'importation du noyau équivalentes (Schmieder B. 2005). L'importation du cytoplasme vers le noyau de Smad4 se produit grâce à l'interaction de l'importine- α 1 avec le domaine MH1 (séquence NLS) (Xiao Z. 2003b), mais aussi grâce à une interaction directe entre Smad4 et les nucléoporines CAN/Nup214 (Xu L. 2003). L'exportation du noyau vers le cytoplasme a été décrite comme dépendante de CRM-1 qui se lie sur une séquence NES portée par le domaine linker (figure 37) (Watanabe M. 2000) (Pierreux C. E. 2000).

La rétention des R-Smads dans le cytoplasme à l'état basal est en partie due aux interactions entre les R-Smads et des partenaires cytoplasmiques.

Le partenaire le mieux décrit est la protéine SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) (Tsukazaki T. 1998). SARA lie le phosphatidyl inositol 3 phosphate (PI3P) de la membrane plasmique et des endosomes primaires par son domaine FYVE (domaine initialement identifié dans Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) et interagit avec le domaine MH-2 de Smad2/3. Cette interaction permet de séquestrer les Smad2/3 à la membrane et ainsi de rapprocher ces protéines des récepteurs susceptibles de les phosphoryler (figure 37). Une autre protéine à domaine FYVE a été décrite comme coopérante avec SARA : il s'agit de HGS (Hepatocyte Growth factor-regulated tyrosine kinase Substrate) (Miura S. 2000). Endofine est une autre protéine de cette famille à être décrite comme interagissant avec les Smads. Cependant son rôle est débattu. Initialement décrite comme liant Smad4 et ALK5 et favorisant la réponse au TGF- β via Smad2/3 (Chen Y. G. 2007), elle fut ensuite décrite comme interagissant avec la voie des BMPs et non celle du TGF- β (figure 37) (Shi W. 2007). Si des études confirment ce rôle, endofine serait alors l'équivalent de SARA pour la voie BMP.

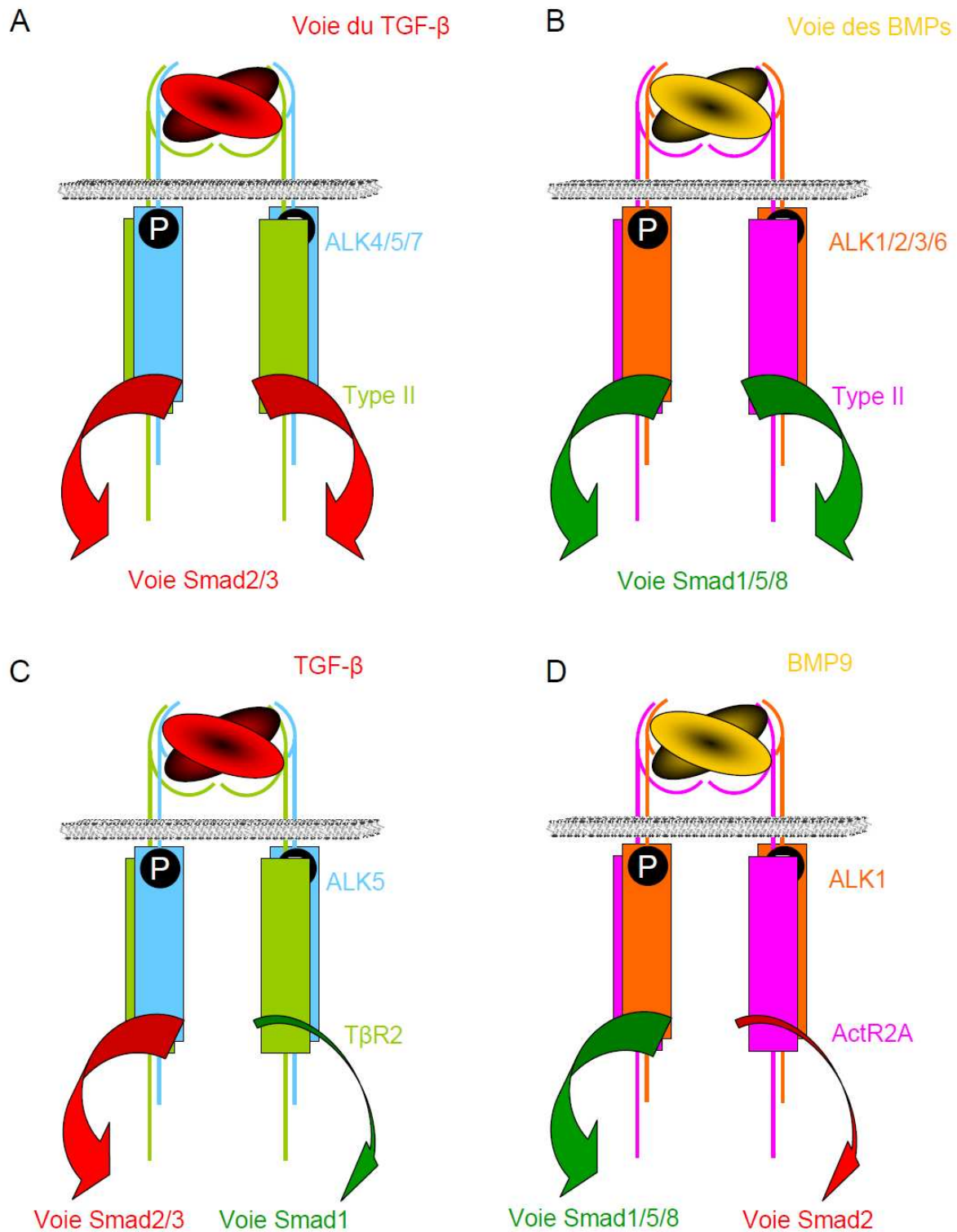


Figure 38 : Schématisation des deux voies Smads.

A : Voie dite du TGF-β avec phosphorylation de Smad2/3.

B : Voie dite des BMPs avec phosphorylation de Smad1/5/8.

C : Particularité d'ALK5 capable de phosphoryler fortement les Smads de la voie du TGF-β mais aussi de phosphoryler faiblement Smad1.

D : Particularité d'ALK1 capable de phosphoryler fortement les Smads de la voie des BMPs mais aussi de phosphoryler faiblement Smad2.

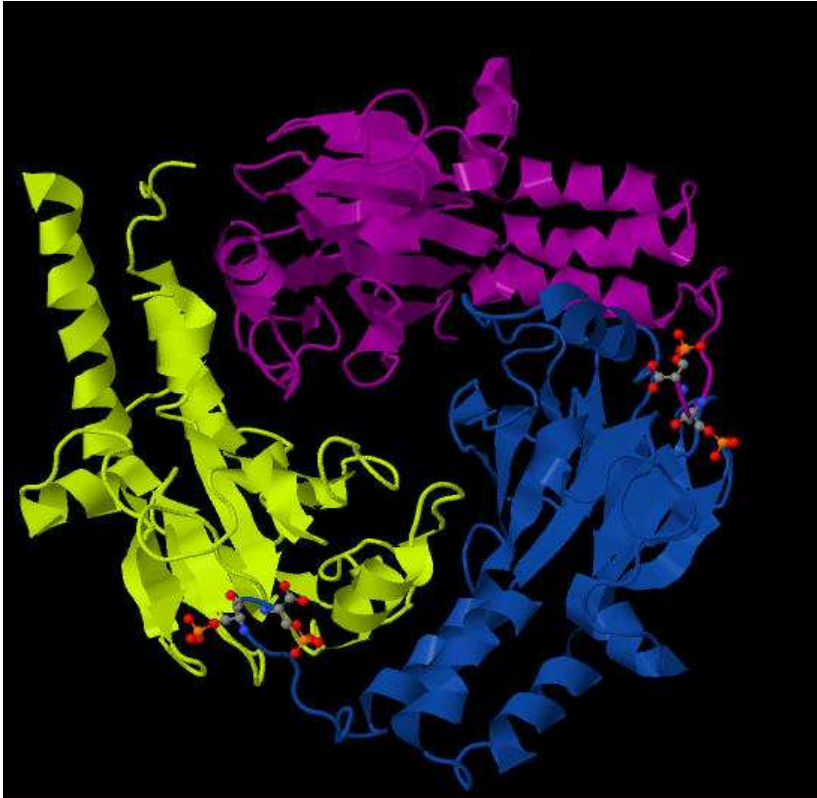
D'autres partenaires cytoplasmiques ont été décrits comme Disabled-2 (Hocevar B. A. 2001), Dok-1 (Yamakawa N. 2002), l'axine (Furuhashi M. 2001), l'ELF β -spectrine (Tang Y. 2003). Les protéines TRAP1 et TLP interagissent avec les récepteurs et facilitent la formation des complexes Smad2 ou Smad3/Smad4 (Wurthner J. U. 2001) (Felici A. 2003). Enfin, CD44, une protéine transmembranaire, a été décrite comme pouvant recruter Smad1 à proximité des récepteurs (figure 37) (Peterson R. S. 2004).

Concernant la complexation des Smads à l'état basal, Smad2 a été trouvée sous une forme monomérique uniquement, alors que Smad3 et Smad4 peuvent former des homotrimères (Jayaraman L. 2000). Cependant, seuls des monomères peuvent être exportés du noyau vers le cytoplasme (Chen H. B. 2005).

Activation des R-Smads par phosphorylation et oligomérisation

Les R-Smads sont directement phosphorylées sur les deux sérines de leur domaine SXS (extrémité C-terminale) par les récepteurs de type 1 activés (figure 36). Deux voies sont alors distinguables : la voie dite du TGF- β et la voie des BMPs. En effet, les sept récepteurs de types 1 ne sont pas capables de phosphoryler les cinq R-Smads (Kretzschmar M. 1997b) (Macias-Silva M. 1996). Les récepteurs ALK4 (récepteur de l'activine), ALK5 (appelé aussi T β R1, récepteur du TGF- β) et ALK7 (récepteur de nodal) phosphorylent Smad2 et Smad3. Par contre les récepteurs des BMPs (ALK1, ALK2, ALK3, ALK6) phosphorylent Smad1, Smad5 et Smad8 (également appelée Smad9) (figure 38A-B). La spécificité des substrats aboutissant à la division de la voie Smad en deux branches est due à des variations mineures dans les séquences d'acides aminés au niveau de la boucle L45 du récepteur de type 1, et dans la boucle L3 du motif MH2 des R-Smads (Chen Y. G. 1998). Cependant, deux travaux montrent que ALK5 peut phosphoryler les Smads de la voie des BMPs (Liu I. M. 2009) (Wrighton K. H. 2009b). TGF- β induit alors une phosphorylation de Smad1, mais de manière tardive et transitoire par rapport à la phosphorylation de Smad3 en réponse à TGF- β ou de Smad1 en réponse aux BMPs (figure 38C) (Wrighton K. H. 2009b). Inversement, BMP9 peut via son récepteur ALK1 phosphoryler Smad2 dans des cellules endothéliales, en plus des Smads de la voie des BMPs (Upton P. D. 2009). La phosphorylation de Smad2 par ALK1 est cependant faible et nécessite des doses plus importantes de BMP9 que pour la

A



B

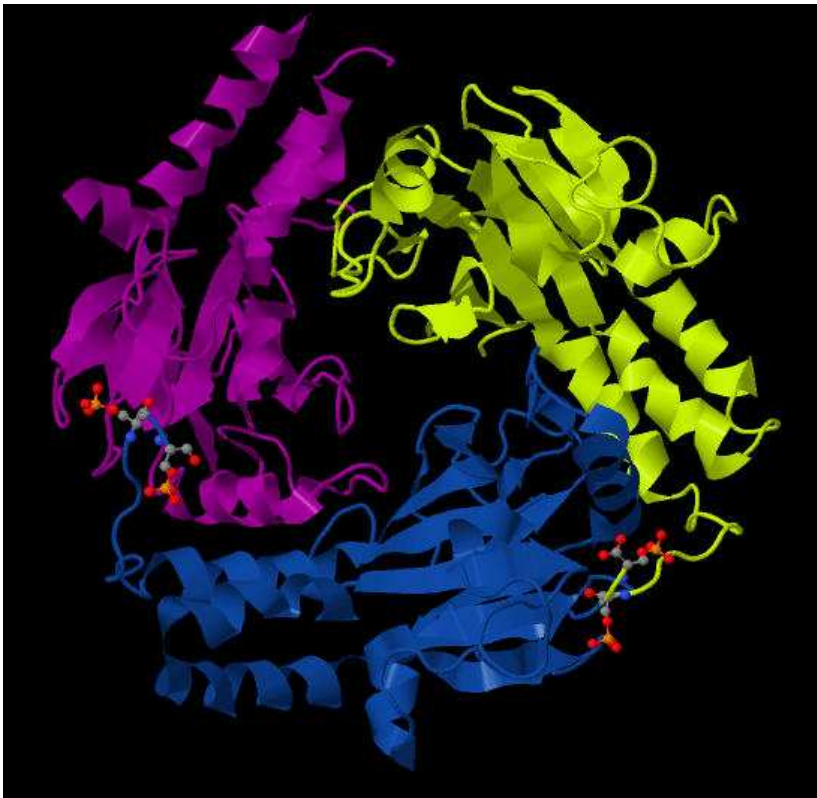


Figure 39 : Structure cristallographique de complexes trimériques de Smads.

A : Complexe de deux P-Smad2 (en bleu et violet) avec Smad4 (en vert).

B : Complexe de deux P-Smad3 (en bleu et violet) avec Smad4 (en vert).

D'après (Chacko B. M. 2004).

phosphorylation de Smad1/5 (figure 38D). L'ensemble de ces travaux montrent néanmoins que la séparation des deux voies Smad n'est pas totalement stricte.

La phosphorylation de Smad2/3 sur le motif SXS déstabilise l'association de la Smad avec SARA, entraînant la libération de la Smad phosphorylée (que je noterai P-Smad) et l'exposition de la NLS (Xu L. 2000).

Les P-Smads libérées dans le cytoplasme peuvent alors s'oligomériser. La structure de P-Smad2 a permis d'expliquer le mécanisme moléculaire de la formation de l'homotrimère mais aussi de la liaison R-Smad/Smad4 (Wu J. W. 2001) ; les sérines phosphorylées pouvant interagir avec quatre acides aminés du domaine MH2 présents chez Smad2 et Smad4 (figure 39). La phosphorylation des R-Smads apparaît alors indispensable à la formation d'un homo- ou d'un hétéro-complexe stable. La stœchiométrie de ces complexes a été débattue. Les complexes dont l'activité est la plus forte sont composés de deux P-R-Smads identiques couplées à une Smad4 (Chacko B. M. 2001) (Qin B. Y. 2001). Cependant, P-Smad2 peut aussi former un homotrimère (Wu J. W. 2001). Le rôle de ces homotrimères est inconnu puisque seuls des complexes avec Smad4 sont trouvés au niveau endogène et toutes les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré la présence de Smad4 couplée au P-R-Smad (Massague J. 2005). Il a été aussi suggéré qu'un hétérodimère P-R-Smad/Smad4 pouvait être actif pour la transcription de certains gènes (Inman G. J. 2002a). Cependant, le modèle le plus accepté et le plus soutenu par les cristallographies et les immunoprécipitations est celui d'un hétérotrimère P-R-Smad/P-R-Smad/Smad4. Notons juste que deux récentes études montrent un effet de P-Smad1/5 sur la maturation des MicroRNA par une interaction avec DROSHA (Davis B. N. 2008) (Davis B. N. 2010). Cette action est Smad4 indépendante et pourrait donc être réalisée par un homotrimère de P-R-Smad.

L'hétérotrimère ainsi formé doit alors transiter vers le noyau afin de pouvoir activer la transcription de gènes cibles. Les différents mécanismes de transport des Smads au travers de la membrane nucléaire ont déjà été présentés. Je soulignerai juste que l'importation du complexe contenant P-Smad2 ou P-Smad3 peut se faire par interaction directe avec les nucléoporines (Chen H. B. 2005) ou par l'intermédiaire d'importines (Kurisaki A. 2001), comme pour l'état basal des Smads. La vitesse d'importation des hétérotrimères semble comparable à la vitesse d'importation des R-Smads (Schmieder B. 2005). Par contre, l'exportation n'étant possible qu'à l'état monomérique, l'hétérotrimère ne peut plus sortir du noyau ce qui provoque son accumulation dans celui-ci (Chen H. B. 2005).

Effet transcriptionnel des Smads.

L'hétérotrimère peut lier l'ADN via les domaines MH1 des Smads. Cependant, l'affinité des Smads pour l'ADN est trop faible pour une action sans partenaire. L'hétérotrimère nécessite la présence de cofacteurs pour lier l'ADN avec une forte affinité.

Le domaine de liaison des Smads sur l'ADN est une boucle β du domaine MH1. Cette boucle est commune à l'ensemble des R-Smads et de Smad4 et ne confère donc pas de spécificité aux différentes voies des Smads (Shi Y. 1998). Seul le transcript le plus fréquent de Smad2, qui possède un insert à proximité de la boucle β , ne peut pas lier l'ADN (Shi Y. 1998). Le rôle de ce transcript est inconnu puisqu'il non seulement n'inhibe pas la réponse au TGF- β mais la transduit. La séquence consensus initiale de liaison des Smads sur l'ADN est : 5'-GTCTAGAC-3' (Zawel L. 1998). Plus tard, il a été montré que la partie 5'-GTCT-3' ou son complémentaire 5'-AGAC-3' était suffisant pour lier les Smads. Ces séquences s'appellent SBE pour Smad Binding Element (Shi Y. 1998). La plupart des promoteurs des gènes régulés par les Smads contiennent une ou plusieurs SBE. La liaison du domaine MH1 sur l'ADN tolère une certaine flexibilité de la séquence, notamment concernant le second nucléotide du SBE précédemment cité, puisque ce nucléotide n'intervient pas dans la liaison des Smads (Shi Y. 1998). Les R-Smads, et plus particulièrement les Smads de la voie des BMPs, peuvent aussi lier des séquences riches en GC (5'-GCCGnCGC-3') (Kim J. 1997) (Xu X. 1998). Ainsi, différentes constructions ont été réalisées à partir de ces séquences consensus pour pouvoir suivre l'activation d'un des deux voies Smad spécifiquement ou des deux voies Smad. La séquence BRE (BMP Responsive Element) est par ailleurs composée de deux séquences SBE et d'une séquence riche en GC qui lui confère une spécificité pour la voie des BMPs (Katagiri T. 2002) (Lopez-Rovira T. 2002).

L'hétérotrimère de Smads doit recruter des cofacteurs. Ces cofacteurs permettent de réguler la réponse aux Smads sur quatre paramètres. Le premier paramètre est la spécificité des gènes cibles. Le complexe P-R-Smads/Smad4/Cofacteurs nécessite les séquences appropriées avec une distance et une orientation correctes sur les promoteurs cibles. Sur les centaines de promoteurs qui contiennent les SBE, seuls peu auront les séquences nécessaires à la liaison du complexe. Le second niveau de régulation est la spécificité des voies Smad. En effet, certains cofacteurs peuvent lier les complexes contenant P-Smad1/5/8, tandis que

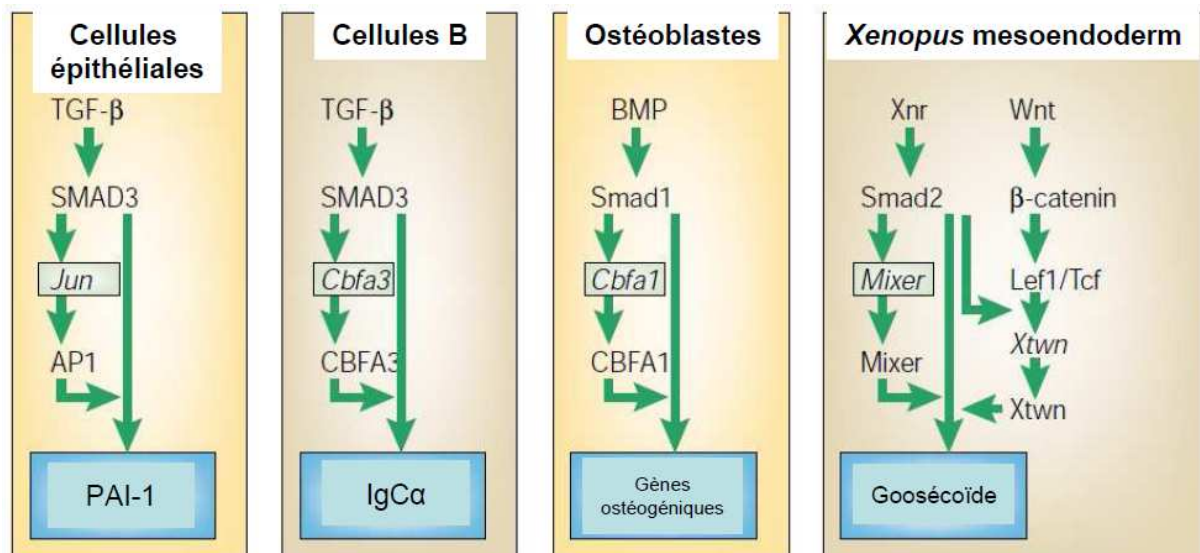


Figure 40 : Interférences entre la voie Smad et d'autres voies de signalisation.

Dans les cellules épithéliales, la voie Smad induit AP1, facteur de transcription qui s'associe à Smad pour induire le gène *pai-1*. Dans les lymphocytes B, l'immunoglobuline α est induite par un complexe Smad/CBFA3, avec CBFA3 elle-même induite par la voie Smad. Dans les ostéoblastes Smad1 induit CBFA1 et ensemble ces protéines induisent des gènes ostéogéniques. Enfin, dans le développement du Xénope, Smad2 induit Mixer. Xtnw est induit par Smad2 en coopération avec Wnt. Smad2, Mixer et Xtnw activent alors le gène *goosecoïde*. D'après (Massague J. 2000).

d'autres lieront les complexes contenant P-Smad2/3. Ces différences permettent de distinguer les réponses de la voie TGF- β de celles de la voie BMP. La spécificité cellulaire est la troisième régulation. En fonction des cofacteurs exprimés par la cellule, les réponses à un même ligand peuvent varier. Enfin, l'effet transcriptionnel des Smads (activateur ou répresseur) est dicté par les cofacteurs. Les cofacteurs peuvent suffire à induire une réponse transcriptionnelle après liaison aux Smads, mais dans certains cas des coactivateurs ou des corépresseurs supplémentaires sont nécessaires (Massague J. 2005).

Ces cofacteurs peuvent être induits ou activés par d'autres voies de signalisation. Par exemple, la voie Wnt/ β -caténine interagit avec la voie du TGF- β en formant un complexe β -caténine/Smad4. Ce complexe induit alors XTwn, gène nécessaire au développement chez *Xenopus* (figure 40) (Nishita M. 2000).

Terminaison de la signalisation Smad

Inman et collaborateurs ont montré en 2002 que le maintien de l'activité des récepteurs dans le temps était nécessaire pour la conservation de l'activité de la voie Smad. Ainsi, en traitant des cellules qui expriment ALK5 avec du TGF- β , les auteurs observent une phosphorylation de Smad2 dès 10 mn, maximale après 45 mn et qui se maintient pendant 5 h. En ajoutant un inhibiteur d'ALK5 (le SB-431542) après 1 h de traitement au TGF- β , la phosphorylation de Smad2 n'est plus détectable 30 mn après l'addition de l'inhibiteur. Les auteurs concluent donc à une phosphorylation instable des Smads, qui doivent être régulièrement (re)phosphorylées par les récepteurs activés. De plus, les auteurs montrent dans ce papier que les Smads une fois phosphorylées s'accumulent dans le noyau, mais qu'une exportation vers le cytoplasme subsiste (Inman G. J. 2002b). Ainsi, la présence de phosphatases nucléaires qui désactiveraient les R-Smads en déphosphorylant leur queue SXS est fortement suggérée. Ces phosphatases ont récemment été identifiées, au moins en partie. Un premier criblage de serine/thréonine phosphatases a été réalisé en testant l'activité de ces enzymes à déphosphoryler Smad2/3. Pratiquement, les expérimentateurs ont coexprimé Smad2/3, une forme d'ALK5 constitutivement active, et une des 39 phosphatases testées. Il advient alors que PPM1A/PP2C α , une phosphatase nucléaire, réduit le niveau de P-Smad2/3 induit par ALK5. Une confirmation par interférence ARN de la forme endogène de cette protéase a été réalisée, aboutissant à une phosphorylation de Smad2/3 plus durable dans le noyau (Lin X. 2006). Cette même phosphatase a été montrée comme active sur P-Smad1/5/8

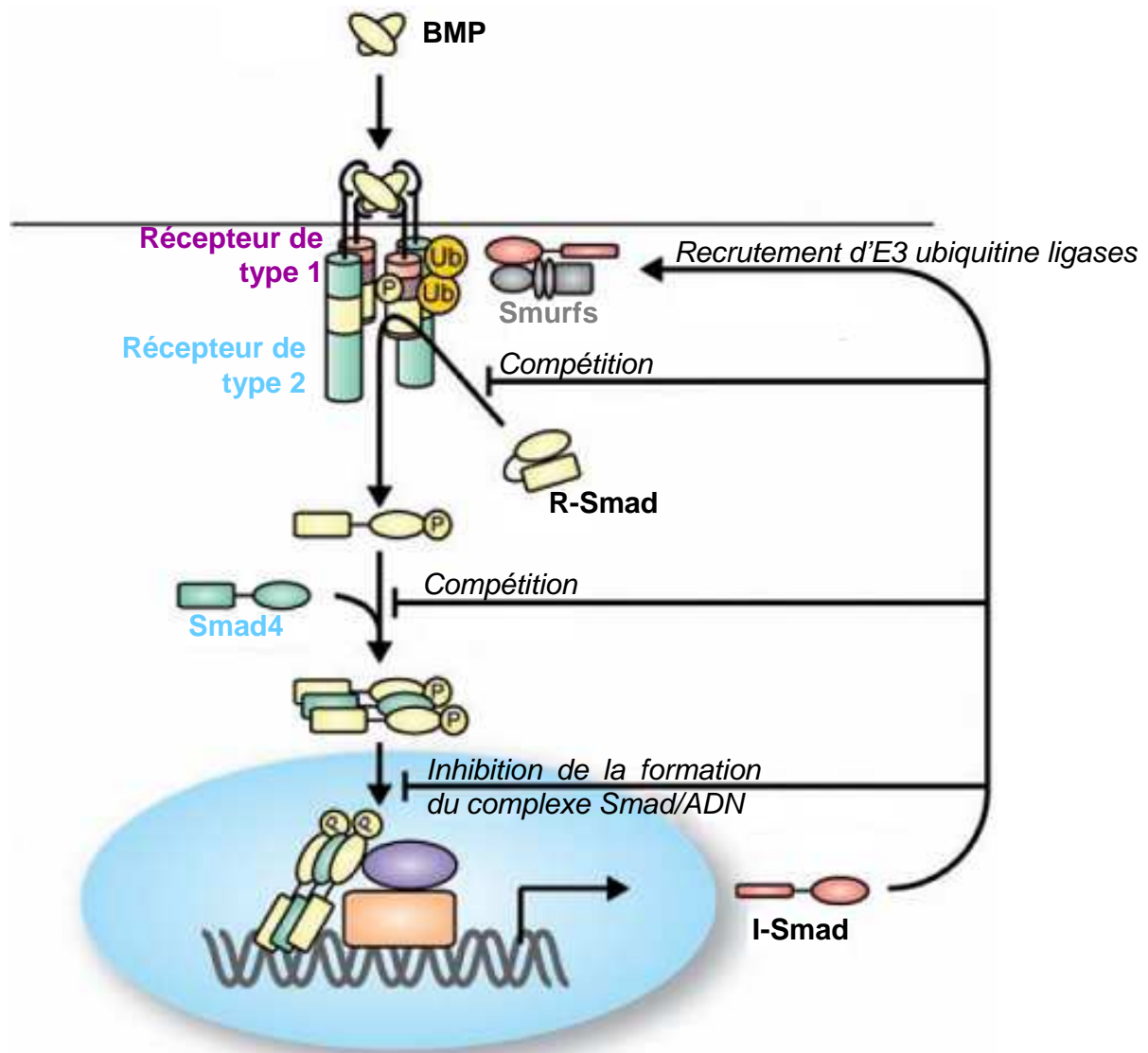


Figure 41 : Modes d'action des I-Smads.

La stimulation de la voie Smad induit l'expression des I-Smads. Les I-Smads agissent en **retrocontrôle négatif** sur la voie Smad par différents mécanismes. D'après (Miyazono K. 2010).

(Duan X. 2006). D'autres protéases ont été identifiées comme MTMR4 (myotubularin-related protein 4), qui déphosphoryle P-Smad2/3 au niveau des endosomes primaires, inhibant ainsi leur translocation nucléaire (Yu J. 2010). Enfin, SCP-1/2/3 (Small C-terminal domain Phosphatase, enzyme nucléaire) (Knockaert M. 2006) et PDP (Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase) (Chen H. B. 2006) ont une activité phosphatase sur P-Smad1.

La phosphorylation des récepteurs peut aussi être la cible de phosphatases. Ainsi PP1 α peut déphosphoryler ALK5 via l'intervention de la Smad inhibitrice Smad7 (Shi W. 2004). Les récepteurs de type 1 de la voie des BMPs sont aussi sensibles à des phosphatases, comme Dullard (Satow R. 2006). Les auteurs montrent que Dullard induit la dégradation des récepteurs de type 1 et de type 2, après déphosphorylation, par le protéasome.

Les Smads inhibitrices (I-Smads) permettent aussi l'arrêt de la signalisation (figure 41). Elles sont au nombre de deux : Smad6 et Smad7. Smad6 cible préférentiellement la voie BMP (Smad1/5/8) (Imamura T. 1997) (Hata A. 1998), tandis que Smad7 agit sur les deux voies (BMP et TGF- β) (Hayashi H. 1997) (Nakao A. 1997). Les I-Smads ont plusieurs mécanismes d'action. Au niveau basal, les I-Smads sont nucléaires. Une stimulation au TGF- β entraîne une exportation de Smad7 vers le cytoplasme et la membrane plasmique (Itoh S. 1998). Cette exportation est due à la liaison de Smad7 avec Smurf2, une E3 ubiquitine ligase (Kavsak P. 2000). Un complexe similaire Smad6/7 - Smurf1 est aussi formé dans le noyau. Les complexes Smurf - Smad7 peuvent alors cibler les récepteurs activés et entraîner l'ubiquitinylation des récepteurs et de Smad7, aboutissant à une dégradation par le protéasome ou les lysosomes (Kavsak P. 2000) (Suzuki C. 2002) (Tajima Y. 2003). Les complexes avec Smurf1 ciblent les récepteurs de la voie BMP (Murakami G. 2003). Notons aussi que Smurf1 et 2 liées à Smad7 peuvent induire la dégradation de Smad4 (Moren A. 2005). Smurf1 cible aussi Smad1/5 (Zhu H. 1999) et Smurf2 cible Smad1/5/2 (Lin X. 2000). Les I-Smads peuvent aussi agir en entrant en compétition avec les R-Smads, soit au niveau des récepteurs, soit pour la liaison avec Smad4. Ainsi P-Smad1 peut former un complexe avec Smad6 à la place de Smad4, aboutissant à un complexe inactif (Hata A. 1998). Smad7 lie par son domaine MH2 les récepteurs de type 1 activé et empêche ainsi l'activation des R-Smads (Hayashi H. 1997) (Nakao A. 1997). Notons que l'expression de Smad7 est induite par TGF- β , l'activine et les BMPs (Nakao A. 1997) (Ishisaki A. 1998) (Benchabane H. 2003) et celle de Smad6 par les BMPs (Afrakhte M. 1998) (Ishida W. 2000), ce qui montre bien le rôle des I-Smads dans la régulation et l'arrêt de la signalisation Smad par rétrocontrôle négatif.

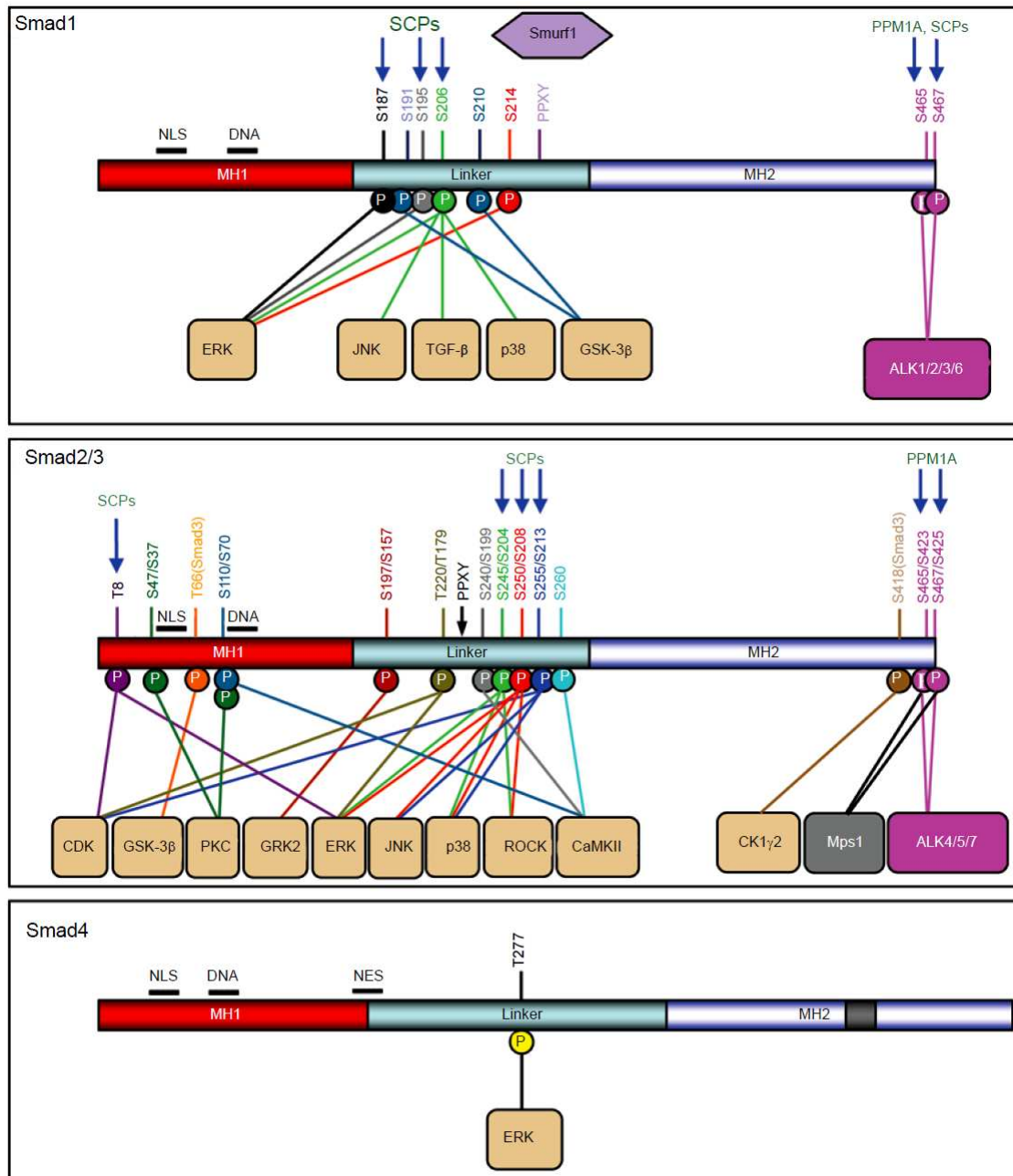


Figure 42 : Sites de phosphorylation des Smads.

SCP : Small C-terminal Domain Phosphatases, phosphatases qui déphosphorylent certains sites des Smads. DNA : site de fixation à l'ADN. D'après (Wrighton K. H. 2009a).

Régulateurs de la voie Smad

Plusieurs modifications post-traductionnelles des Smads régulent l'activité de ces dernières.

Je vais commencer par présenter les phosphorylations régulatrices de l'activité des Smads. En plus du site de phosphorylation du domaine MH2 des Smads par les récepteurs de type 1, les Smads peuvent être phosphorylées sur d'autres sites dans la région "linker" (figure 42). Ainsi, Erk-1 et Erk-2 phosphorylent Smad1/2/3 dans la région "linker" ce qui diminue l'accumulation nucléaire de ces Smads et donc leur activité (Kretzschmar M. 1997a) (Kretzschmar M. 1999). Cependant, la phosphorylation de ces Smads par Erk a été décrite comme augmentant l'activité transcriptionnelle par d'autres études (Hayashida T. 2003). Smad3 peut aussi être phosphorylée par les CDK (Cyclin-Dependant Kinase) (Matsuura I. 2004), ou encore Smad2 par les CamK2 (Ca^{2+} and calModulin-dependant Kinase 2) (Wicks S. J. 2000). Ces phosphorylations diminuent l'activité des Smads. Les séquences de la région "linker" étant peu conservées entre les R-Smads, les phosphorylations de ces régions par les différentes voies de signalisation peuvent permettre de moduler finement les voies Smad individuellement. La protéine GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) phosphoryle la région "linker" de Smad1 et Smad3, ce qui induit leur complexation avec Smurf1 et leur dégradation (Sapkota G. 2007) (Fuentealba L. C. 2007) (Guo X. 2008).

Une autre modification post-traductionnelle altère la réponse des Smads : la sumoylation. Cette modification est proche de l'ubiquitinylation, avec l'ajout d'un groupement SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier protein) et n'a été décrite que pour Smad4. La E3 SUMO ligase PIAS sumoyle Smad4 sur la lysine 159, et dans une moindre mesure sur la lysine 113 (Lee P. S. 2003). Cette sumoylation est augmentée par la voie p38 MAPK en réponse au TGF- β (Ohshima T. 2003). Le rôle de cette sumoylation est peu clair. En effet, des expériences de mutagenèse tendent à montrer une augmentation de la stabilité de Smad4 lors de la mutation des sites de sumoylation. Etant donné que ces sites peuvent aussi être ubiquitinylés et donc servir à la dégradation de Smad4, il est impossible de conclure à un effet de la sumoylation seule sur Smad4. L'activité transcriptionnelle de Smad4 sumoylée est aussi débattue, certains groupes montrant une augmentation de la localisation nucléaire et de son activité transcriptionnelle pour Smad4 sumoylée (Lin X. 2003), alors que d'autres groupes ont

montré une augmentation de l'activité transcriptionnelle pour les Smad4 mutées sur les sites de sumoylation (Long J. 2004).

L'ubiquitinylation des Smads par les Smurfs a été présentée dans la partie précédente. Je voudrais juste rajouter que d'autres E3 ubiquitine ligases permettent l'ubiquitinylation des Smads, comme CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein) qui permet la dégradation de Smad3 (Xin H. 2005) ou encore Tiul1/WWP1 pour Smad2 (Seo S. R. 2004) (Komuro A. 2004).

Enfin, l'acétylation des Smads modifie leur activité ainsi que leur ubiquitinylation. Smad7 peut-être acétylée par p300, une protéine nucléaire, sur deux résidus lysine (K60 et K70), résidus ubiquitinylables. Cette acétylation empêche Smurf d'ubiquitinyler Smad7. Smad7 acétylée est retenue dans le noyau (Gronroos E. 2002). SIRT1 déacétyle Smad7, ce qui entraîne son exportation vers le cytoplasme et permet aussi son ubiquitinylation (Kume S. 2007). CBP (CREB Binding Protein) et p300 acétylent Smad2/3 avec des conséquences sur l'activité de ces Smads (Inoue Y. 2007).

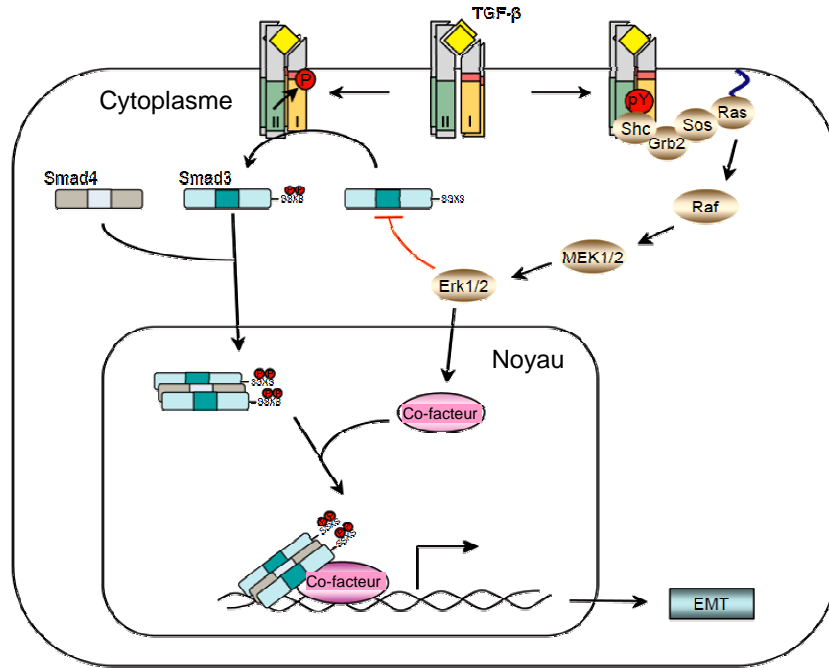
2.3.2 Les voies de signalisation Smad-indépendantes

La signalisation des membres de la famille du TGF- β est supportée par une multitude de signaux intracellulaires en plus de la voie Smad. Ces voies non canoniques, Smad-indépendantes, sont activées directement par les récepteurs liant un ligand et modulent les réponses cellulaires. Ces voies incluent les voies des MAPKs, des protéines GTPases, ou encore la voie PI3K/Akt.

Les voies des MAP kinases

La voie des MAPKs est une cascade de trois protéines kinases partant d'une MAP kinase kinase kinase (ou MAPKKK ou MAP3K), qui active une MAP kinase kinase (MAPKK), activant à son tour une MAP kinase (MAPK). Ces protéines kinases interviennent dans de nombreux processus biologiques et sont activées par de multiples stimuli. Il existe trois sous-familles de MAPK : Erk (Extracellular-signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases) et p38.

A



B

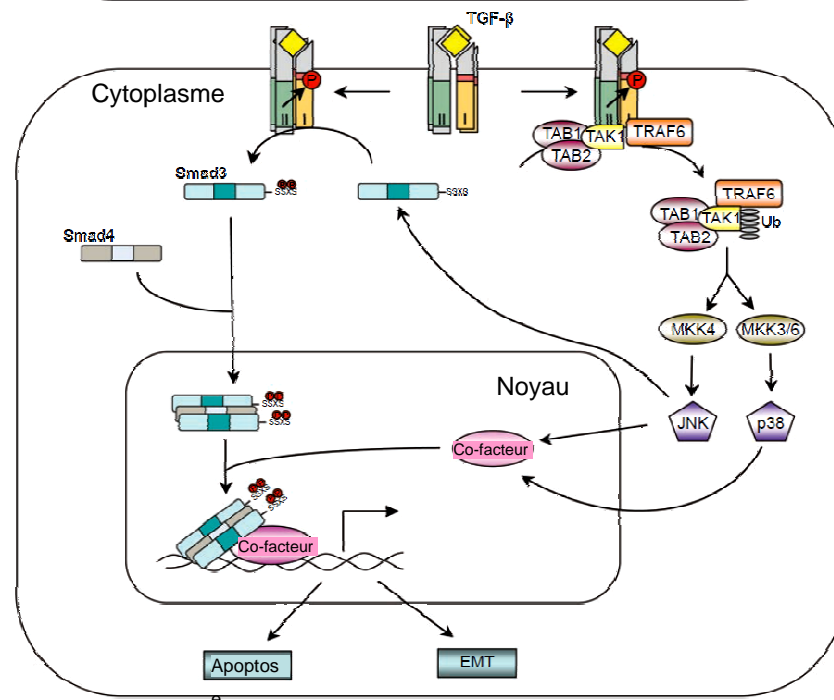


Figure 43 : Activation des voies Smad-indépendantes par TGF- β – 1^{ère} partie

Activation des MAP kinases par le TGF- β .

A : Activation de la voie Erk par TGF- β . TGF- β peut induire la phosphorylation de Shc par ALK5 sur des résidus tyrosines. Shc phosphorylée recrute alors Grb2/Sos et active la voie Erk par l'intermédiaire de Ras, Raf et de la cascade de MAP kinases qui s'en suit. Erk peut inhiber la voie Smad en phosphorylant la "région lien" des R-Smads, et peut réguler l'expression de gènes impliqués dans l'EMT par l'intermédiaire de facteurs de transcription en aval de Erk.

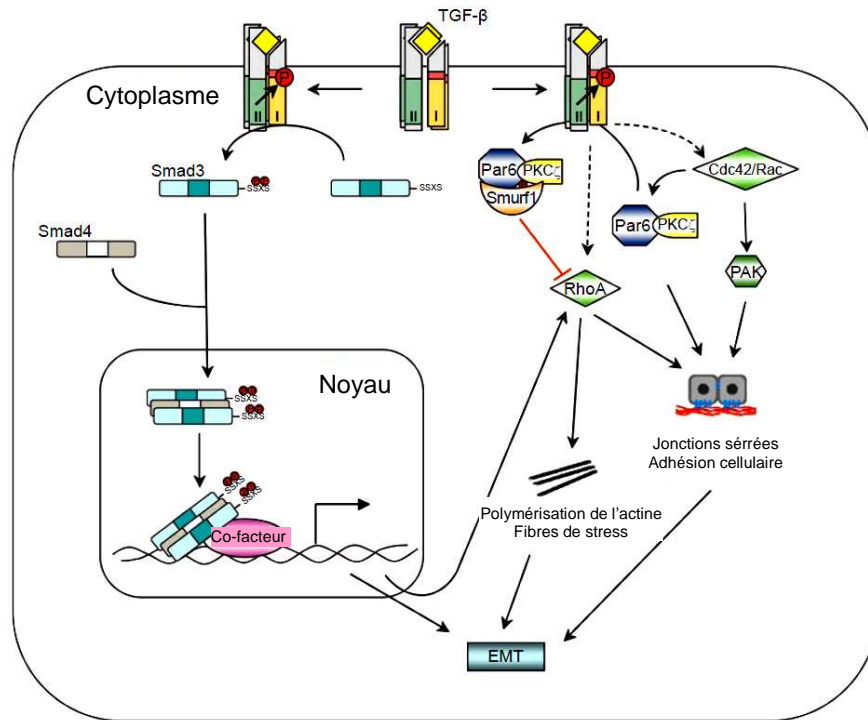
B : Activation de la voie JNK/p38 par TGF- β . ALK5 interagit avec TRAF-6 qui subit alors une Lys-63 ubiquitinylation. TRAF-6 ainsi activée recrute TAK1, ainsi que TAB1 et 2 (TAK1 Binding protein). Ce complexe active alors les voies JNK et p38. Ces voies régulent l'apoptose et l'EMT. JNK peut aussi réguler la voie Smad en phosphorylant les R-Smads.

D'après (Zhang Y. E. 2009).

La première preuve d'une activation de la voie MAPK par TGF- β a été l'observation de l'activation rapide de Ras dans des cellules épithéliales du rat (Mulder K. M. 1992) (Yan Z. 1994). Ras est une petite protéine G membranaire qui active Raf, une autre protéine G cytoplasmique activatrice des MAP3Ks (figure 43A). L'activation de Erk par TGF- β fut alors confirmée dans plusieurs types de cellule (Hartsough M. T. 1995) (Frey R. S. 1997b) (Mucsi I. 1996). L'activation de Ras ne se fait pas directement par ALK5 mais par l'intermédiaire d'un complexe ShcA/Grb2/Sos. ShcA est directement activée par ALK5 par phosphorylation sur des résidus sérine et tyrosine (bien que ALK5 soit principalement une sérine/thréonine kinase) (Lee M. K. 2007). Cette voie Erk est impliquée dans la transition épithélial-mésenchymateuse (EMT) induite par TGF- β (Thiery J. P. 2003) (Lee J. M. 2006). Notons enfin que Erk peut phosphoryler les Smads sur la région "linker", inhibant ainsi leur activité transcriptionnelle (figure 42) (Kretzschmar M. 1999).

TGF- β peut aussi activer les voies JNK (Frey R. S. 1997a) (Engel M. E. 1999) (Hocavar B. A. 1999) et p38 (Hanafusa H. 1999) (Sano Y. 1999) (Bhowmick N. A. 2001b) (Yu L. 2002) via la MAP3K TAK-1 (TGF- β -Activated Kinase 1) (Yamaguchi K. 1995). ALK5 active TAK-1 via TRAF-6 (TNF Receptor Associated Factors-6) (figure 43B) (Sorrentino A. 2008) (Yamashita M. 2008). TRAF6 est une E3 ubiquitine ligase capable de lier ALK5 et ALK6 (Sorrentino A. 2008). Lorsque TGF- β ou des BMPs lient ALK5 ou ALK6, la formation du complexe de récepteurs permet la dimérisation de TRAF6 qui s'ubiquitinye alors, ce qui l'active (Sorrentino A. 2008) (Yamashita M. 2008). TRAF6 activée ubiquitinye à son tour TAK1 (Sorrentino A. 2008) (Yamashita M. 2008). L'ubiquitinylation de TRAF6 et TAK1 est une Lys-63 ubiquitinylation (Sorrentino A. 2008) (Yamashita M. 2008) qui n'induit pas la dégradation de la protéine, contrairement à une Lys-48 ubiquitinylation, mais intervient dans l'interaction des protéines (Haglund K. 2005). TAK1 ubiquitinylée devient active et s'autophosphoryle puis phosphoryle MKK4 et MKK3/6 activateurs respectivement de JNK et p38 (figure 43B) (Zhang Y. E. 2009). La nécessité de l'activité kinase d'ALK5 pour l'activation de TRAF6/TAK1 n'est pas clairement définie, puisque deux travaux de 2008 aboutissent à deux résultats opposés, l'un mettant en avant la nécessité de l'activité kinase d'ALK5 pour l'activation de TRAF6 (Yamashita M. 2008), l'autre concluant à son inutilité (Sorrentino A. 2008). Les deux équipes ayant réalisé des expériences très similaires dans les mêmes cellules (HEK293), il est très difficile de les départager. Les voies JNK et p38 sont aussi impliquées dans l'EMT induite par TGF- β (Yamashita M. 2008).

A



B

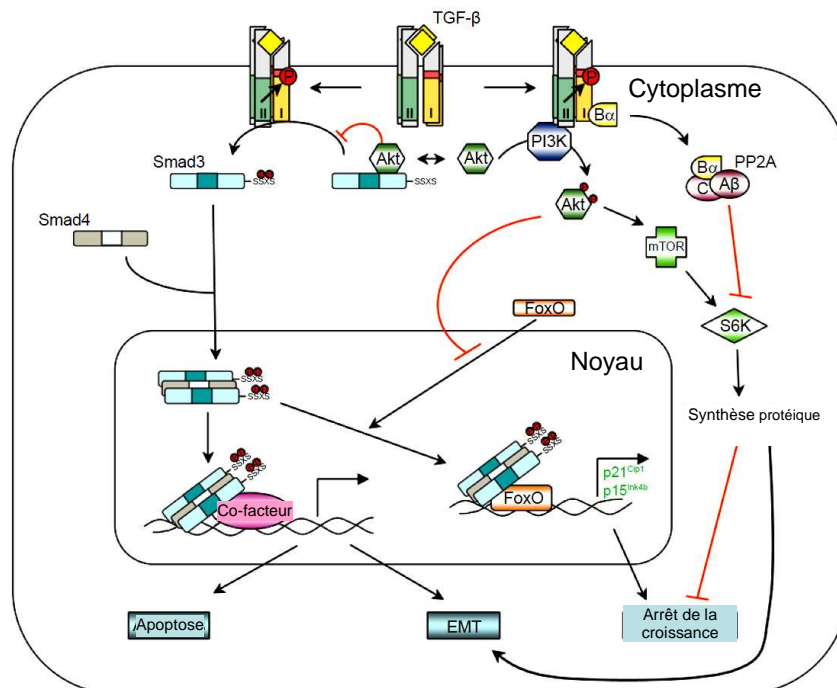


Figure 44 : Activation des voies Smad-indépendantes par TGF- β – 2^{ème} partie.

A : Activation des voies des petites protéines G par le TGF- β . ALK5 peut activer RhoA de manière dépendante et indépendante des Smads. RhoA induit les fibres de stress d'actine pendant l'EMT. TGF- β peut dissoudre les jonctions serrées en recrutant Cdc42 au niveau des complexes de récepteurs et en induisant la dégradation de RhoA via Par6/Smurf1.

B : Activation de la voie PI3K/Akt par TGF- β . L'activation de la PI3K par ALK5 active la cascade Akt/mTOR/S6K. Cette voie est impliquée dans l'EMT. A noter que TGF- β peut inhiber S6K via PP2A mais que S6K peut inhiber la voie Smad3 en séquestrant Smad3 dans le cytoplasme et en inhibant FoxO, facteur de transcription qui interagit avec la voie Smad.

D'après (Zhang Y. E. 2009).

Les petites protéines G de type Rho

Les protéines GTPases comme RhoA, Rac et Cdc42 jouent un rôle dans le contrôle dynamique du cytosquelette, la mobilité cellulaire et l'expression de gènes.

TGF- β active rapidement RhoA, ce qui induit la formation de fibres de stress et l'EMT (figure 44A) (Bhowmick N. A. 2001a) (Edlund S. 2002). Cependant, TGF- β induit aussi une régulation négative de RhoA au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées. Par-6, une protéine échafaudage présente dans ces cellules, interagit avec ALK5 au niveau des jonctions serrées. Lors de la stimulation par TGF- β , ALK5 phosphoryle Par-6 qui recrute alors Smurf1. Le complexe Par-6/Smurf1 ubiquitinye RhoA (figure 44A). La dégradation de RhoA induit la dissolution des jonctions serrées, et donc l'EMT (Ozdamar B. 2005) (Gao L. 2002). TGF- β a donc un effet double sur RhoA.

TGF- β peut aussi activer Cdc42 GTPase qui agit sur les jonctions serrées par une action sur l'occludine (Barrios-Rodiles M. 2005).

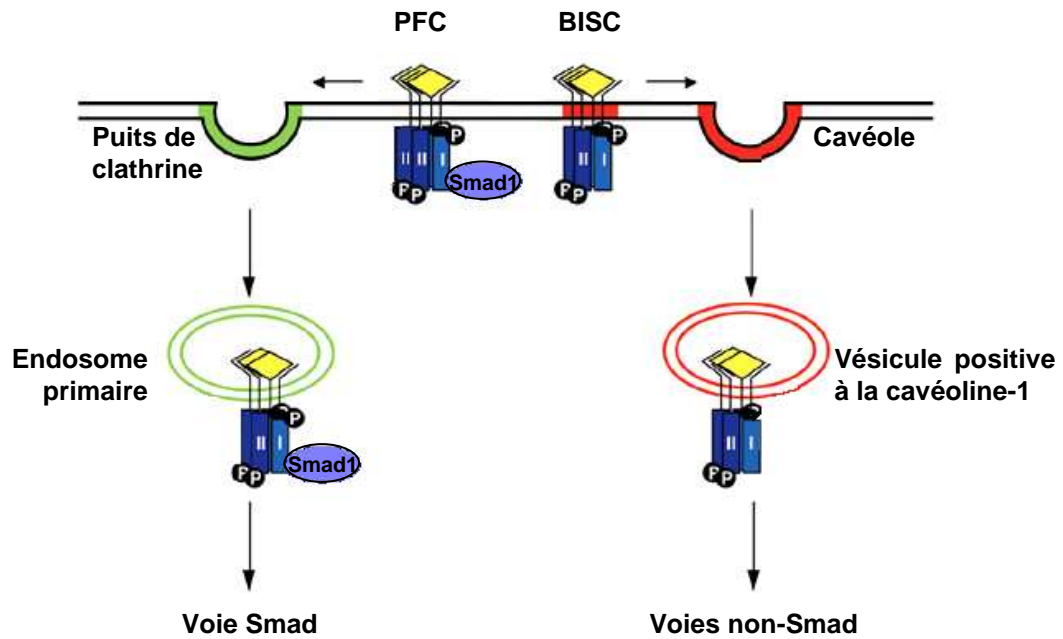
Concernant la signalisation des BMPs, LIM kinase-1 (LIMK-1) est liée par BMPR2 et est activée par la voie des BMPs. Cette activation requiert Cdc42 et induit un changement dans le cytosquelette (Foletta V. C. 2003) (Lee-Hoeflich S. T. 2004).

La voie PI3K/Akt

La PI3K (Phosphatidyl Inositol 3-phosphate Kinase) est capable de phosphoryler le PIP2 (Phosphatidyl Inositol biPhosphate) en PIP3. PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase-1), qui lie PIP3, peut alors phosphoryler Akt (qui lie aussi PIP3), qui devient alors active.

TGF- β induit une rapide phosphorylation d'Akt, indépendante de Smad2/3 (figure 44B) (Wilkes M. C. 2005). T β R2 lie p85, l'unité régulatrice de PI3K, qui est activée lors de la stimulation de TGF- β (Yi J. Y. 2005). Cependant, TGF- β régule négativement la voie PI3K/AKT par l'expression SMAD-dépendante de SHIP, une lipide phosphatase qui déphosphoryle le PIP3 en PIP2 (Valderrama-Carvajal H. 2002). L'induction de la voie Akt par TGF- β est donc transitoire. D'un autre côté Akt activée lie Smad3 et empêche son importation dans le noyau, inhibant ainsi la voie Smad (Conery A. R. 2004) (Remy I. 2004). De plus, Akt phosphoryle FoxO, un facteur de transcription indispensable à l'inhibiteur de la prolifération par

A



B

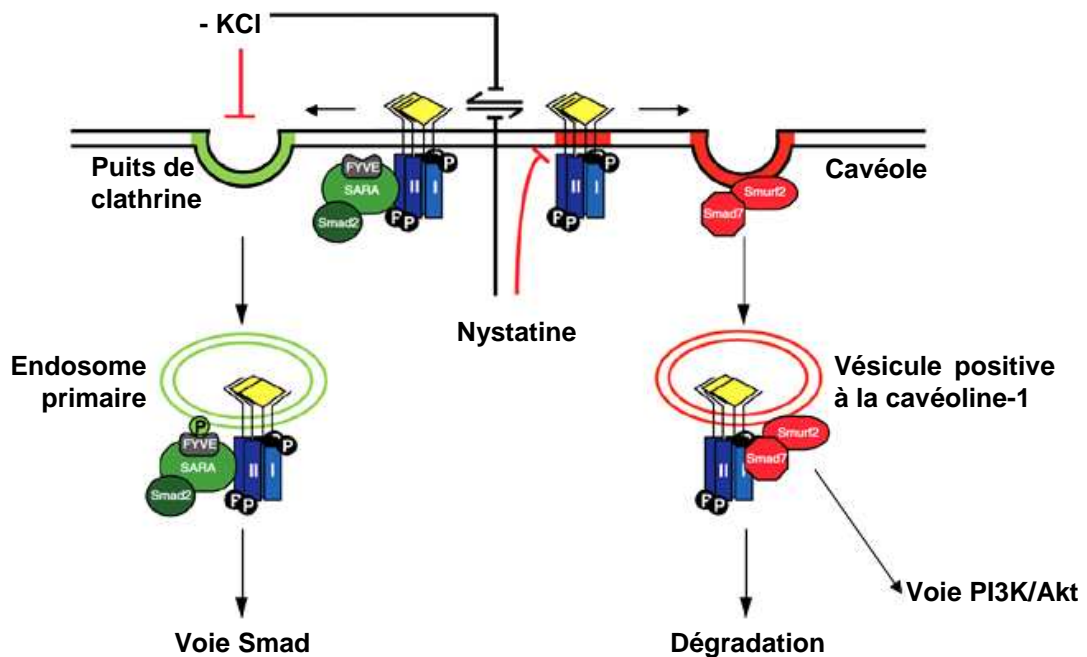


Figure 45 : Déterminisme des voies de signalisation.

A : Les complexes de récepteurs des BMPs formés avant la liaison du ligand (PFC) sont endocytés par puits de clathrine et signalisent par la voie Smad. Les complexes de récepteurs des BMPs formés après la liaison du ligand sont dans les radeaux lipidiques et sont endocytés par cavéole et signalisent par les voies indépendantes des Smads.

B : Les récepteurs du TGF- β endocytés par puits de clathrine signalisent par la voie Smad. Les récepteurs du TGF- β endocytés par cavéoline sont destinés à être dégradés ou signalisent par la voie PI3K/Akt.

D'après (Di Guglielmo G. M. 2003).

TGF- β (inhibition Smad-dépendante). FoxO phosphorylée perd sa localisation nucléaire et ne peut plus induire la transcription des gènes d'arrêt du cycle cellulaire avec P-Smad2/3 (Seoane J. 2004) (Gomis R. R. 2006). Enfin, la voie mTor (Mammalian Target Of Rapamycin), qui est activée par Akt, est impliquée dans l'EMT induite par TGF- β (Lamouille S. 2007).

2.3.3 Déterminisme des voies de signalisation

Au vue de la variété des voies de signalisation Smad-indépendantes activées par la famille TGF- β et des interactions entre ces voies et la voie Smad, nous comprenons la grande variété de réponses des différents types cellulaires à un même stimulus. Une compréhension des mécanismes qui induisent les différentes voies est donc fondamentale pour pouvoir mieux comprendre cette diversité de réponse des cellules.

Comme je l'ai déjà présenté précédemment, il existe deux modes d'endocytose des récepteurs de la famille TGF- β : un mode par puits de clathrine et un mode par cavéoline. Ces modes d'endocytose pourraient être à l'origine du choix de transduction du signal, Smad-dépendante ou indépendante. En effet, les travaux de P. Knaus montrent une activation de la voie Smad pour les récepteurs internalisés par des puits de clathrine, alors que les voies non-Smad, responsables entre autre de l'induction de l'alkaline phosphatase par les BMPs, seraient activées par les récepteurs internalisés dans les radeaux lipidiques (figure 45A). De plus, le mode d'internalisation dépendrait du mode de formation des complexes des récepteurs. Les complexes formés avant la liaison du ligand (PFC) seraient associés aux puits de clathrine, alors que ceux formés lors de la liaison du ligand seraient dans les radeaux lipidiques (figure 45A) (Nohe A. 2002) (Hartung A. 2006). Concernant les récepteurs du TGF- β , une déplétion en potassium, qui bloque l'endocytose par puits de clathrine, réduit la phosphorylation de Smad2 par TGF- β (Hayes S. 2002), alors que la déplétion en cholestérol induite par l'utilisation de Nystatin, augmente la réponse P-Smad2 du TGF- β (Di Guglielmo G. M. 2003). Ceci montre bien que la voie Smad est activée par les récepteurs présents dans les puits de clathrine (figure 45B). De plus, une interaction entre Smad7, Smurf, les récepteurs du TGF- β et cavéoline-1 (présente dans les radeaux lipidiques) a été rapportée. Ainsi, les récepteurs présents dans les radeaux lipidiques seraient destinés à être dégradés (figure 45B) (Di Guglielmo G. M. 2003). Cependant, l'induction du procollagène I par TGF- β via la voie PI3K/Akt est dépendante de cavéoline-1, ce qui confirme la possibilité d'une signalisation Smad-dépendante dans les puits de clathrine et Smad-indépendante dans les radeaux

lipidiques (figure 45B) (Kim S. 2008). Certaines protéines peuvent modifier la distribution des récepteurs dans ces deux "zones" de la membrane plasmique. L'interleukine-6 (IL-6) (Zhang X. L. 2005) et ADAM-12 (A Disintegrin And Metalloproteinase-12) (Seals D. F. 2003) peuvent diminuer le nombre de récepteurs dans les radeaux lipidiques au profit des puits de clathrine. Ce déplacement a pour effet d'augmenter l'activation de la voie Smad en réponse au TGF- β . Inversement, deux polysaccharides, l'héparane sulfate (Chen C. L. 2006) et le hyaluronane (Ito T. 2004), augmentent le nombre de récepteurs dans les radeaux lipidiques et atténuent la réponse au TGF- β . Le fait que des molécules puissent déplacer le ratio de récepteurs dans les puits de clathrine par rapport à ceux dans les radeaux lipidiques s'oppose à la théorie des complexes de récepteurs préformés dans le réticulum endoplasmique avant la liaison du ligand et siégeant dans les puits de clathrine face aux complexes de récepteurs formés lors de la liaison du ligand au niveau des radeaux lipidiques.

2.4 Les régulateurs de l'activation des récepteurs

L'activité des ligands de la famille du TGF- β peut-être finement régulée à plusieurs niveaux : par une action sur le ligand, par une action sur les récepteurs, par une action sur les Smads et enfin par une action sur les cofacteurs de transcription interagissant avec les P-Smads. Je vais présenter brièvement ici les principaux régulateurs de la voie TGF- β .

2.4.1 *Les régulations liant des ligands*

Les ligands de la famille du TGF- β sont sécrétés et agissent sur leur récepteur de manière autocrine, paracrine, voire même endocrine pour les ligands circulants. Leur signalisation peut être régulée par une variété de protéines liant ces ligands ou entrant en compétition avec ces ligands pour la liaison aux récepteurs. Les antagonistes extracellulaires des BMPs, qui agissent par liaison sur ces derniers, sont caractérisés par un nœud cystéique (comme pour les ligands). Cinq sous-groupes ont été décrits : la noggine, la famille de la chordine, la Tsg (twisted gastrulation), la famille Dan, et enfin la famille de la follistatine.

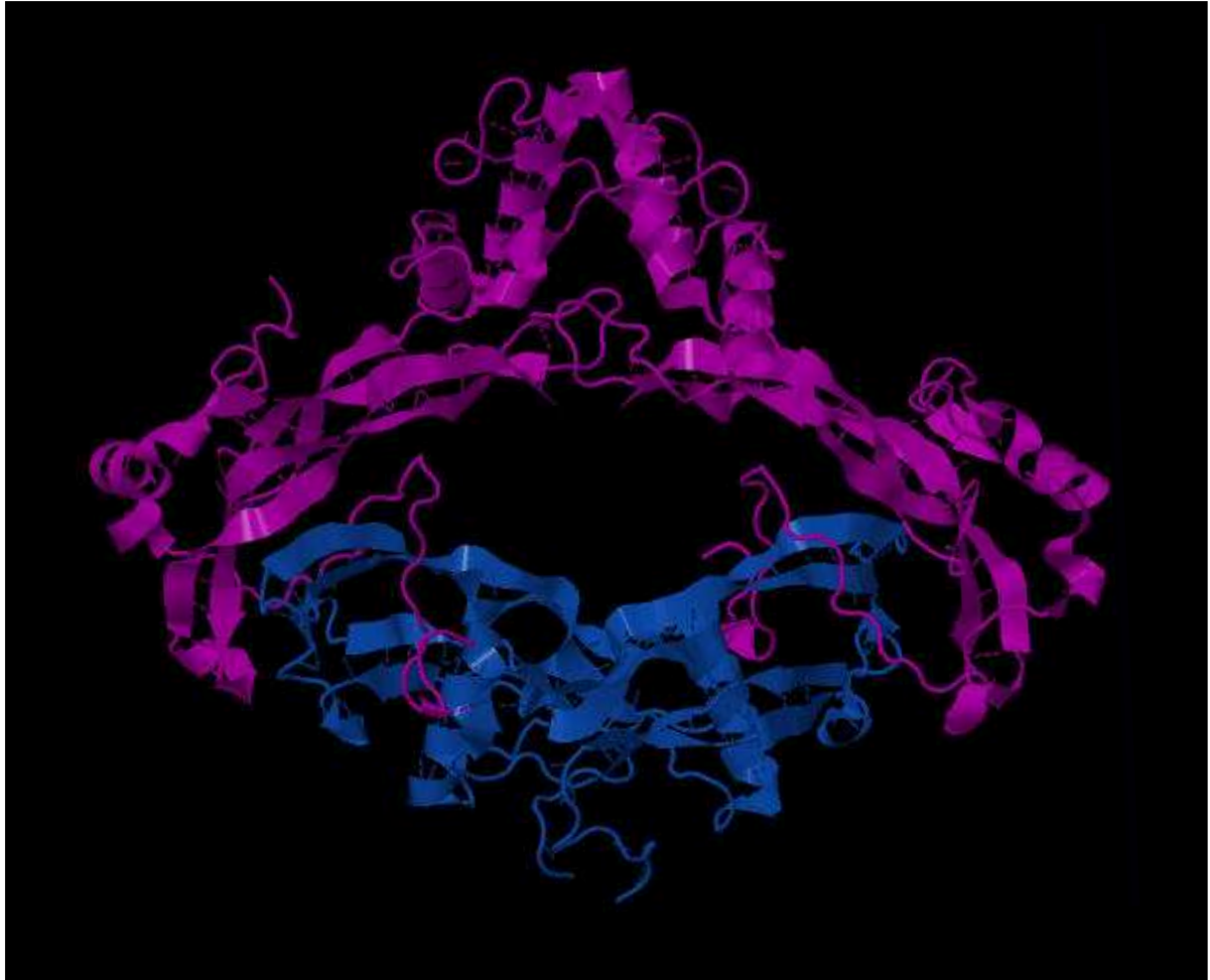


Figure 46 : Structure cristallographique du complexe BMP7 (en bleu)/Noggin (en violet).
D'après (Groppe J. 2002).

La noggine

Dans la gastrula, les tissus de l'embryon ne sont pas déterminés, excepté la partie antérieure de la lèvre dorsale du blastopore. Ce tissu est capable d'induire la formation d'un autre axe dorsal/ventral. Cette région, découverte par Hans Spemann, est nommée l'organisateur de Spemann. La noggine a été la première protéine sécrétée par cette région identifiée. Elle lie avec une grande affinité et inhibe BMP2 et BMP4, et dans une moindre mesure BMP7 (Zimmerman L. B. 1996). La résolution du complexe BMP7/noggine, premier cristal d'un antagoniste des BMPs, a révélée une structure de la noggine conforme à celle des membres de la famille TGF- β (figure 46). Cependant, les "doigts" de la noggine sont plus longs que ceux des BMPs, et induisent une courbure des extrémités des BMPs, altérant les domaines de liaison aux récepteurs (Groppe J. 2002) (Groppe J. 2003). La liaison de la noggine sur les cytokines de la famille TGF- β peut être inhibée par la mutation d'un acide aminé de la séquence. Ainsi, la mutation de l'asparagine 445 de GDF5, retrouvée dans des cas de syndrome de synostoses multiples, rend cette cytokine résistante à la noggine alors que sa forme sauvage est inhibée par la noggine (Seemann P. 2009). BMP9 et BMP10, naturellement résistantes à la noggine, ne possèdent pas d'asparagine équivalente dans leur séquence contrairement aux autres BMPs, ce qui explique en partie la résistance des ces deux BMPs à la noggine (Seemann P. 2009). BMP6 est aussi résistante à la noggine, mais c'est la lysine 60 qui lui confère cette propriété (Song K. 2010).

La famille de la chordine

La chordine, découverte aussi dans l'organisateur de Spemann, lie exclusivement BMP2, BMP4 et BMP7. La chordine inhibe ces BMPs, mais BMP1 (une zinc métalloprotéase) peut cliver la chordine, libérant ainsi la BMP liée. Plusieurs protéines ont des séquences voisines, et forment ainsi la famille de la chordine. Parmi eux, notons BMPER (BMP binding Endothelial cell precursor-derived Regulator aussi appelé crossveinless-2). Cette protéine peut avoir un effet inhibiteur ou stimulateur de la voie des BMPs, bien qu'aucune explication sur la détermination de l'action de BMPER ne soit connue. En effet, la surexpression de BMPER inhibe BMP4 (Moser M. 2003), mais l'inactivation de BMPER entraîne une baisse de la voie BMP (Conley C. A. 2000) (Rentzsch F. 2006).

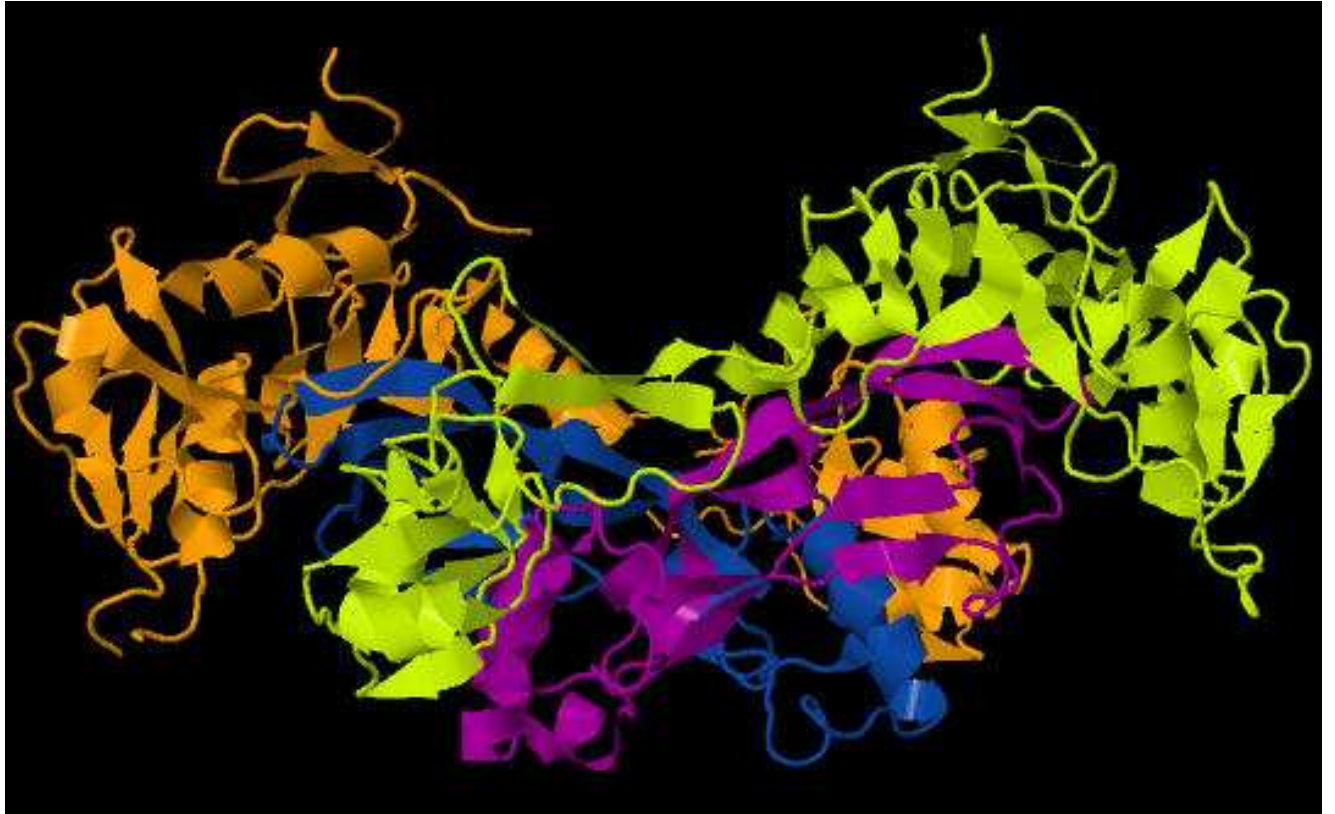


Figure 47 : Structure cristallographique du complexe Activine (en bleu et violet)/Follistatine (en orange et vert).

La follistatine bloque les sites de liaison de l'activine pour ses deux types de récepteurs.
D'après (Thompson T. B. 2005).

La Tsg

Cette protéine a un effet antagoniste et agoniste sur les BMPs en fonction du contexte. Ainsi, Tsg lie directement BMP2 ou BMP4 ou un complexe BMP/chordine, ce qui inhibe la fonction de ces BMPs (Ross J. J. 2001). Cependant, Tsg peut aussi aider au clivage de la chordine par BMP1 et donc à l'action de la BMP libérée (Oelgeschlager M. 2000) (Larrazin J. 2001).

La famille Dan

La famille Dan (Differential screening-selected gene Aberrative in Neuroblastoma) est composée notamment de Gremlin, Cerberus, ou encore Sclerostin. Les membres de cette famille sont capables de lier les BMPs, même si tous les membres ne lient pas l'ensemble des BMPs (Gremlin ne lie que BMP2/4/7 (Hsu D. R. 1998)). Leur effet est inhibiteur sur la voie BMP.

La famille de la follistatine

La follistatine est le premier antagoniste de la famille TGF- β à avoir été identifié. Sa première activité découverte fut son pouvoir inhibant sur l'activine par liaison sur cette dernière (Schneyer A. L. 1994). Depuis, un rôle inhibiteur sur plusieurs BMPs (notamment BMP4/5/6/7/15), et sur la myostatine (GDF8) a été démontré (Otsuka F. 2001) (Glistler C. 2004) (Sidis Y. 2006). La structure de la follistatine liée à l'activine a permis de découvrir les acides aminés impliqués dans la liaison de la follistatine sur les cytokines (figure 47) (Thompson T. B. 2005) (Harrington A. E. 2006). Ainsi, en analysant la conservation de ces acides aminés, les auteurs ont remarqué que BMP9, l'AMH et l'inhibine possèdent un acide aminé supplémentaire dans une boucle nécessaire à la liaison de l'inhibine sur les ligands. Cette insertion confère une conformation locale très différente, d'après la structure de BMP9 (Brown M. A. 2005), de la conformation des autres BMPs. Par conséquent, la follistatine ne peut pas inhiber BMP9 (Harrington A. E. 2006). D'autres protéines apparentées existent (les follistatines like) formant la famille de la follistatine.

2.4.2 Les compétiteurs de liaison sur les récepteurs

Il existe deux grands groupes d'antagonistes entrant en compétition avec les ligands pour la liaison aux récepteurs : les Leftys et les inhibines.

Lefty-1 et Lefty-2 peuvent lier ActR2a et ActR2b, inhibant le signal de nodal ou de l'activine (Schier A. F. 2003).

Les inhibines sont composées d'une chaîne β , présente sous forme d'homodimère dans les activines, et d'une chaîne α qui leur est propre. Les inhibines lient le bétaglycan (co-récepteur pour l'activine), ce dernier leur permettant alors de lier les récepteurs de type 2 de l'activine, et donc d'inhiber son signal (Lewis K. A. 2000).

2.4.3 Les régulateurs liés à la membrane plasmique

Deux protéines homologues, DRAGON et RGMa/b/c (Repulsive Guidance Molecule), sont liées à la membrane par un ancrage GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol). Ils forment un complexe avec les récepteurs de type 1 et augmentent la liaison de BMP2 et BMP4, accroissant ainsi la réponse à ces BMPs (Samad T. A. 2005) (Babitt J. L. 2005) (Halbrooks P. J. 2007).

La famille EGF-CFC (Epidermal Growth Factor – Cripto, FRL1, Cryptic domain) est aussi une famille de protéine avec un ancrage GPI (Minchiotti G. 2000). Cripto, un des membres de cette famille, est indispensable à la signalisation de nodal (Gritsman K. 1999), mais inhibe la signalisation de l'activine (Gray P. C. 2003) et du TGF- β (Gray P. C. 2006).

2.4.4 Les régulateurs transmembranaires

BAMBI (BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) est une protéine transmembranaire qui inhibe les voies du TGF- β , de l'activine et de certaines BMPs. BAMBI a une partie extracellulaire comparable aux récepteurs de type 1 mais ne possède pas de domaine kinase dans sa partie intracellulaire. BAMBI prévient la formation de complexes de récepteurs fonctionnels en interagissant avec les récepteurs de type 1 (sauf ALK2) ou des

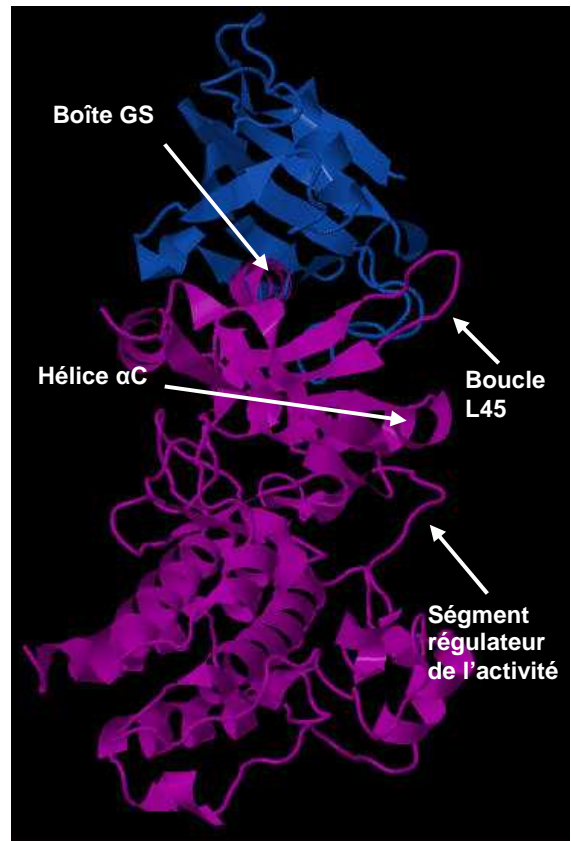


Figure 48 : Structure cristallographique du complexe ALK5/FKBP12.

FKBP12 se lie sur la boîte GS d'ALK5 non phosphorylé, le bloquant en forme inactive.
D'après (Huse M. 1999).

récepteurs de type 2 par son domaine intracellulaire, mais ne lie pas TGF- β ou les BMPs (Onichtchouk D. 1999).

Tomoreguline-1 est aussi transmembranaire et son interaction avec Cripto inhibe le signal de nodal (Harms P. W. 2003). Cette protéine peut aussi inhiber la voie de BMP2 par un mécanisme inconnu à ce jour (Chang C. 2003).

2.4.5 Les régulateurs cytoplasmiques

La protéine FKBP12 interagit avec ALK5 dans sa partie intracellulaire, au niveau du domaine GS phosphorylable par T β R2. Cette protéine permet de garder un niveau de signalisation d'ALK5 en l'absence du ligand très faible, et se détache du récepteur lors de la liaison de TGF- β (figure 48) (Chen Y. G. 1997).

Dapper-2 interagit avec ALK4 et ALK5 au niveau des endosomes et dirigent les récepteurs vers les lysosomes où ils sont dégradés (Zhang L. 2004).

La cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP)-dependent kinase 1 (cGKI) est associée à BMPR2 et module la voie Smad. La liaison de BMP2 induit la dissociation de cGKI de BMPR2. cGKI est alors importée dans le noyau où elle s'associe avec Smad1 et augmente la réponse transcriptionnelle (Schwappacher R. 2009).

2.4.6 Les régulateurs nucléaires

Ski et Sno sont des protéines nucléaires qui, en liant les complexes R-Smad/Smad4, inhibent les voies TGF- β et BMP (Luo K. 2004). FoxG1, un facteur de transcription de la famille Forkhead, lie les complexes Smad/FoxO induits par TGF- β et inhibe leur action (Seoane J. 2004). Enfin, DRAP-1 interagit avec FoxH1, un facteur de transcription indispensable à la signalisation de l'activine et de nodal, et inhibe cette signalisation (Chen X. 1997).

2.4.7 *Les récepteurs solubles*

Un nouveau niveau de régulation a été découvert récemment avec le clivage du domaine extracellulaire de récepteurs du TGF- β .

Le domaine extracellulaire de l'endogline est trouvé dans le sang (Wang J. M. 1994). Ce clivage est réalisé par la protéase MMP-14 (Matrix MetalloProteinase-14) (Hawinkels L. J. 2010). Cette endogline soluble a un rôle peu déterminé, mais ce clivage entraîne une diminution du taux de ce récepteur à la surface des cellules (ce qui pourrait entraîner une diminution de la signalisation BMP) et pourrait aussi lier des ligands, inhibant ainsi leur action.

Le domaine extracellulaire d'ALK5 est aussi clivé, cette fois par ADAM-17. Cette diminution du nombre de récepteurs à la surface de la membrane entraîne une diminution de la signalisation TGF- β (Liu C. 2009).

Partie 3 : La famille TGF- β dans le système cardiovasculaire

Les premières preuves de l'implication de membres de la famille TGF- β dans le système vasculaire ont été l'identification de gènes responsables de maladies vasculaires, gènes appartenant à la famille du TGF- β . Les études des invalidations de ces gènes dans des souris ont permis de confirmer l'implication de la famille dans l'établissement du système cardiovasculaire et de mieux définir le rôle des membres impliqués. Je vais dans un premier temps présenter les membres impliqués dans les maladies vasculaires chez l'homme, puis les études d'invalidation de certains membres et leur effet sur le système vasculaire, et je terminerai par un gros plan sur un récepteur de première importance dans ce système vasculaire : le récepteur de type 1 ALK1.

1. Les maladies vasculaires impliquant des membres de la famille TGF- β

La première maladie génétique vasculaire où l'implication de la famille TGF- β a été démontrée est la maladie de Rendu-Osler appelée aussi HHT pour Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. Depuis deux autres maladies ont été identifiées : l'hypertension pulmonaire familiale, et le syndrome de Loeys-Dietz.

1.1 Implication de la famille TGF- β dans la maladie de Rendu-Osler

La maladie de Rendu-Osler sera développée en détail ultérieurement (Partie 4). Brièvement, cette maladie se caractérise par des dysplasies vasculaires, caractérisées par l'apparition de télangiectasies au niveau des muqueuses, des fistules artério-veineuses dans le foie, les poumons, le système nerveux central et le tube digestif, et enfin par des épistaxis (saignements de nez) particulièrement abondantes et nombreuses.

L'équipe de Douglas Marchuk a identifié les deux principaux gènes responsables de la maladie. En 1994, l'endogline, un récepteur de type 3, est reconnue comme gène responsable de la maladie de Rendu-Osler de type 1 (McAllister K. A. 1994). Deux ans plus tard, le gène pour le type 2 est identifié : il s'agit du récepteur de type 1 ALK1 (Johnson D. W. 1996). Cette

même équipe a aussi identifié un troisième gène responsable de la maladie : Smad4 (Gallione C. J. 2006). Les mutations de *MACH-4* codant pour Smad4 qui sont responsables d'un syndrome associant maladie de Rendu-Osler et polyposie juvénile sont cependant plus rares que les mutations de l'endogline ou d'ALK1.

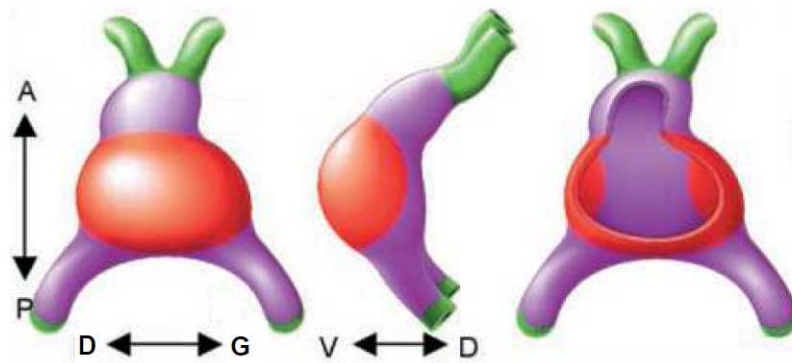
1.2 Implication de la famille TGF- β dans l'hypertension artérielle pulmonaire familiale

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) sera aussi développée en détail plus loin (Partie 4). Cette maladie se caractérise par une constriction des artéioles pulmonaires aboutissant à une augmentation de la pression sanguine dans les poumons. En 2000, le gène responsable pour 70 % des formes héréditaires a été découvert. Il s'agit du récepteur de type 2 BMPR2 (Lane K. B. 2000). De plus, 20 % des personnes atteintes d'une forme idiopathique portent une mutation de ce gène (Machado R. D. 2006). Récemment, des mutations d'*ACVRL1* ont été impliquées dans l'établissement de la maladie (Fujiwara M. 2008). Un cas d'HTAP a été décrit sur un patient porteur d'une mutation non-sens de *Smad8* (Shintani M. 2009).

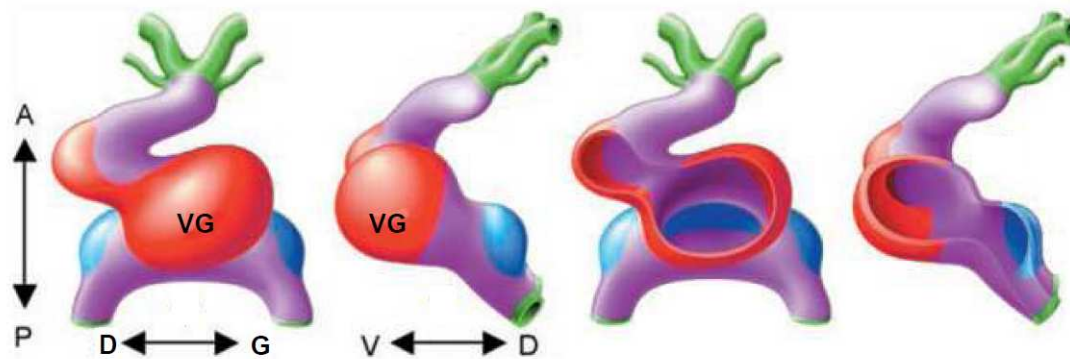
1.3 Implication de la famille TGF- β dans le syndrome de Loeys-Dietz

Le syndrome de Loeys-Dietz est une maladie proche du syndrome de Marfan. Parmi les multiples symptômes de la maladie, des manifestations vasculaires aux conséquences potentiellement mortelles existent. Ainsi un anévrisme aortique ou des artères avec risque de dissection est possible, ainsi que des altérations des valves aortiques. Ce syndrome récemment découvert est dû à des mutations des récepteurs du TGF- β de type 1 (ALK5) ou de type 2 (T β R2) (Loeys B. L. 2005). Le mécanisme moléculaire de cette maladie est peu connu à ce jour.

Embryon de souris à E 8,5



Embryon de souris à E 9,5



Embryon de souris à E 11,5

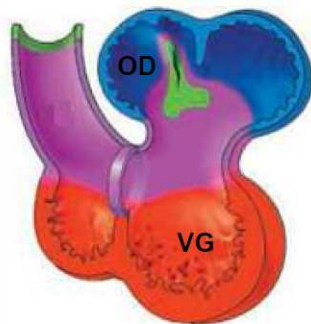


Figure 49 : Développement embryonnaire du cœur de souris.

Axes A-P : antériopostérieur, D-V : dorsoventral, D-G : droite gauche ; VG : Ventricule Gauche, OD : Oreillette Droite.

Brièvement, le tube cardiaque primitif se déforme de manière asymétrique. La division du cœur en quatre chambres se fait par le développement d'excroissances intra-cardiaques, qui se différencient ensuite en valves et septum. D'après (Moorman A. F. 2003).

2. Invalidation de gènes de la famille du TGF- β et phénotypes cardiovasculaires

Dans cette partie je développerai dans un premier temps les invalidations des gènes qui ont une conséquence sur la formation du cœur (en résumé [tableau 1](#)) puis ensuite les invalidations qui ont une conséquence sur le système vasculaire (en résumé [tableau 2](#)).

2.1 Famille TGF- β et formation cardiaque

Le cœur est le premier organe fonctionnel lors de l'embryogenèse. Il apparaît initialement comme deux primordia cardiaques qui fusionnent ensemble pour former le tube cardiaque primitif. Ce tube est constitué d'un endothélium intérieur entouré d'une couche externe : le myocarde. Entre les deux couches se trouve une couche de matrice extracellulaire sécrétée par le myocarde appelée la gelée cardiaque. Le stade de développement suivant consiste en la formation des cavités cardiaques. Le tube cardiaque forme alors des tours et des boucles qui aboutissent à la formation des oreillettes et des ventricules primitifs ([figure 49](#)). L'endothélium subit alors une transition épithélial-mésenchymateuse et les cellules envahissent la gelée cardiaque formant un coussin endocardiaque. Les valves et le septum qui vont diviser le cœur mature en quatre chambres dérivent de ce coussin endocardiaque (Chang H. 2002).

2.1.1 Invalidation de ligand et formation cardiaque

BMP2 fut le premier membre de la famille du TGF- β dont l'implication dans la formation cardiaque a été identifiée. En effet, en 1996, l'invalidation de BMP2 a été montrée comme létale avec des embryons sans cœur ou avec des malformations et un retard de croissance cardiaque très importants. BMP2 est donc indispensable à la formation du tube cardiaque primitif (Zhang H. 1996). L'invalidation de BMP4, BMP voisine de BMP2, spécifiquement dans les cardiomyocytes a permis de mettre à jour le rôle tardif mais indispensable de BMP4 dans la formation du cœur. En effet, l'invalidation de BMP4 étant létale dans les stades précoces du développement de l'embryon, une invalidation

Types de protéines ciblées	Modification génétique	Phénotype	Références
Ligands	Invalidation de BMP2	Létale – malformations cardiaques importantes	(Zhang H. 1996)
	Invalidation de BMP4 dans les cardiomyocytes	Létale – malformations cardiaques importantes	(Jiao K. 2003) (Liu W. 2004)
	Invalidations de BMP5 et BMP7	Létales – malformations cardiaques importantes	(Solloway M. J. 1999)
	Invalidations de BMP6 et BMP7	Létales – malformations cardiaques importantes	(Kim R. Y. 2001)
	Invalidation de BMP10	Létale – hypoplasie cardiaque	(Chen H. 2004)
	Invalidation de TGF- β 2	Létale à la naissance – défauts dans les valves et le septum cardiaques	(Sanford L. P. 1997)
Récepteurs	Invalidation d'ALK3 dans les cardiomyocytes	Létale – malformations cardiaques importantes	(Gaussin V. 2002)
	Invalidation d'ALK2 dans les cellules endothéliales	Létale – défauts dans les valves et le septum cardiaques	(Wang J. 2005)
	Expression d'une forme constitutivement active d'ALK5 dans le myocarde	Létale – défauts d'enroulement du tube cardiaque	(Charng M. J. 1998)
	Expression d'une forme dépourvue du site de fixation des ligands de BMPR2	Létale – malformations des valves et du septum cardiaques	(Delot E. C. 2003)
	Invalidation d'ActR2B	Létalité postnatale – malformation du septum cardiaque	(Oh S. P. 1997)
	Invalidation de l'endogline	Létale – élargissement des ventricules et voies de sortie dilatées	(Arthur H. M. 2000)
Voie Smad	Invalidation de Smad5	Létale – défaut d'enroulement du tube cardiaque	(Chang H. 2000)
	Invalidation de Smad6	Mortalité précoce après la naissance – hyperplasie cardiaque et défauts des valves et du septum	(Galvin K. M. 2000)
	Invalidation de Smad4 dans les cellules endothéliales	Létale – malformations cardiaques importantes	(Lan Y. 2007)

Tableau 1 : Invalidation des gènes de la famille TGF- β et conséquence sur le développement cardiaque.

conditionnelle a été nécessaire pour voir le rôle de BMP4 dans la formation cardiaque. Il en résulte un rôle de BMP4 dans la formation du septum après la formation du coussin auriculo-ventriculaire. Cette invalidation conditionnelle est létale (Jiao K. 2003) (Liu W. 2004).

D'autres BMPs ont été montrées comme indispensables à la formation du cœur. Ainsi, BMP5, 6 et 7 participent au développement cardiaque. Notons que les souris invalidées pour un seul de ces gènes n'ont aucun phénotype cardiaque (Kingsley D. M. 1992) (Solloway M. J. 1998) (Dudley A. T. 1995) (Luo G. 1995). Par contre les souris invalidées pour BMP5 et BMP7 meurent à E 10.5 de multiples défauts cardiaques dont un défaut dans l'établissement des chambres cardiaques (Solloway M. J. 1999). Des malformations similaires sont trouvées sur les souris invalidées pour BMP6 et BMP7 (Kim R. Y. 2001).

BMP10 est aussi primordiale dans la formation cardiaque. BMP10 est normalement exprimée uniquement dans le myocarde du trabécule ventriculaire de manière transitoire (entre E 9 et E 13.5) puis dans l'oreillette à partir de E 12.5 (Neuhaus H. 1999). L'invalidation de ce gène entraîne des défauts cardiaques majeurs à partir de E 9.5 et une mort des embryons entre E 10 et E 10.5 suite à des malformations cardiaques importantes. Les souris invalidées BMP10 ont une hypoplasie cardiaque consécutive à une diminution de la prolifération des cardiomyocytes (Chen H. 2004). La même équipe a montré deux ans après que la surexpression de BMP10 dans les ventricules après la naissance dans des souris transgéniques aboutissait à une diminution de la croissance cardiaque postnatale suite à une hypotrophie des cardiomyocytes (Chen H. 2006). Il est donc nécessaire d'avoir une expression transitoire de BMP10, restreinte à la période correspondante à la prolifération des cardiomyocytes.

Enfin, l'abolition de TGF- β 2 induit des défauts dans le développement des valves et du septum du cœur entraînant une mortalité à la naissance (Sanford L. P. 1997).

2.1.2 Invalidation de récepteur et formation cardiaque

Concernant les récepteurs, ALK2, ALK3, ALK5, BMPR2 et l'endogline ont un rôle dans la formation du cœur.

L'invalidation d'ALK2 et d'ALK3 aboutit à une mort embryonnaire très tôt (stade gastrulation). Cependant, une inactivation d'ALK3 dans les cardiomyocytes uniquement aboutit à un défaut de l'établissement du coussin auriculo-ventriculaire ainsi qu'à une malformation du septum (Gaussin V. 2002). Une inactivation d'ALK2 dans les cardiomyocytes ne donne aucun phénotype, par contre une invalidation d'ALK2 dans les

Types de protéines ciblées	Modification génétique	Phénotype	Références
Ligands	Invalidation de TGF- β 1	Variable en fonction du fond génétique. Affection de la vasculogénèse et de l'hématopoïèse.	(Dickson M. C. 1995) (Bonyadi M. 1997)
Récepteurs	Invalidation d'ALK3 dans les cellules Flk+ ou dans les cellules de muscle lisse	Létale – défaut de remodelage vasculaire et de maturation des vaisseaux, présence d'hémorragies abdominales	(Park C. 2006) (El-Bizri N. 2008)
	Invalidation d'ALK1	Létale – défauts majeurs d'angiogénèse dans le sac vitellin et dans l'embryon, vaisseaux dilatés, fistules artério-veineuses, recrutement des cellules de muscle lisse défaillant, perte de l'expression d'EphrineB2	(Urness L. D. 2000) (Oh S. P. 2000) (Roman B. L. 2002)
	Invalidation d'ALK1 dans les cellules endothéliales	Létale – défauts d'angiogénèse, vaisseaux dilatés et tortueux, fistules artério-veineuses	(Park S. O. 2008)
	Invalidation d'ALK1 inductible dans les cellules endothéliales	Invalidation à l'âge adulte létale – hémorragies importantes	(Park S. O. 2009)
	Invalidation d'ALK5	Létale – vaisseaux dilatés et peu recouverts par les cellules de muscle lisse	(Larsson J. 2001)
	Invalidation d'ALK5 dans les cellules endothéliales	Phénotype controversé. Identique à l'invalidation d'ALK5 totale ou aucun phénotype	(Carvalho R. L. 2004) (Park S. O. 2008)
	Invalidation de BMPR2 par shRNA (70 à 90 % d'inhibition)	Viable – dilatation postnatale des vaisseaux, quelques saignements et défauts de recouvrement par les cellules de muscle lisse	(Liu D. 2007)
	Invalidation de T β R2	Létale – défauts semblables à l'invalidation de TGF- β 1 : défaut dans le remodelage du plexus vasculaire primitif, la différenciation des cellules endothéliales et l'hématopoïèse	(Oshima M. 1996)
	Invalidation de l'endogline	Létale – défauts d'angiogénèse, fistules artério-veineuses	(Bourdeau A. 1999) (Li D. Y. 1999) (Arthur H. M. 2000)
	Invalidation de l'endogline inductible dans les cellules endothéliales	Viable – fistules artério-veineuses dans l'angiogénèse de la rétine, prolifération excessive des cellules endothéliales	(Mahmoud M. 2010)
Voie Smad	Invalidation du bétaglycan	Létal – défaut des vaisseaux coronaires entraînant une défaillance cardiaque	(Compton L. A. 2007)
	Invalidation de Smad5	Létale – défauts d'angiogénèse comparables à ceux de l'invalidation d'ALK1 ou de l'endogline	(Chang H. 1999) (Yang X. 1999)
	Invalidation de Smad5 dans les cellules endothéliales ou les cellules de muscle lisse	Viable – aucun phénotype vasculaire	(Umans L. 2007)
	Invalidation de Smad4 dans les cellules endothéliales	Létale – défauts du remodelage vasculaire	(Lan Y. 2007)
	Invalidation de Smad1	Létale – Défauts d'angiogénèse mineurs	(Lechleider R. J. 2001)
	Invalidation de Smad6	Viable – défauts cardiaques, calcification vasculaire, hypertension	(Galvin K. M. 2000)
	Invalidation de Smad8	Viable – remodelage vasculaire pulmonaire spontané	(Huang Z. 2009)
Voie Smad-indépendante	Invalidation de TAK1	Létale – défauts d'angiogénèse comparables à ceux de l'invalidation d'ALK1	(Moya I. 2010)
Gènes cibles des BMPs	Invalidations d'Id1 et d'Id3	Létales – défauts d'angiogénèse, vaisseaux dilatés, hémorragies cérébrales	(Jadrich J. L. 2006) (Lyden D. 1999)

Tableau 2 : Invalidation des gènes de la famille TGF- β et conséquence sur le développement vasculaire.

cellules endothéliales donne des malformations cardiaques en inhibant l'EMT des cellules endothéliales dans la gelée cardiaque pour former le coussin auriculo-ventriculaire. Ceci aboutit à des défauts dans les valves et le septum (Wang J. 2005).

ALK5 pourrait aussi jouer un rôle dans l'enroulement du tube cardiaque puisque l'expression dans le myocarde d'une forme constitutivement active d'ALK5 arrête cet enroulement (Charng M. J. 1998).

L'expression d'une forme dépourvue du site de fixation des ligands de BMPR2 entraîne une malformation des valves cardiaques ainsi qu'une séparation incomplète des ventricules (pas de séparation entre l'artère pulmonaire et l'aorte) (Delot E. C. 2003).

L'inactivation d'ActR2B entraîne une léthalité postnatale avec notamment une malformation du septum cardiaque (Oh S. P. 1997).

Enfin, l'inactivation de l'endogline aboutit à un cœur dont les ventricules sont élargis et les voies de sortie dilatées (Arthur H. M. 2000).

2.1.3 Invalidation de la voie Smad et formation cardiaque

L'inactivation de Smad5 entraîne un défaut dans l'enroulement du tube cardiaque létal au stade embryonnaire (Chang H. 2000). L'inactivation de Smad6 entraîne une hyperplasie cardiaque ainsi qu'un défaut des valves et du septum entraînant une mortalité précoce après la naissance (Galvin K. M. 2000). L'inactivation de Smad4 dans les cellules endothéliales conduit aussi à des malformations cardiaques avec un cœur élargi, et une absence du coussin endocardiaque (Lan Y. 2007).

2.2 Famille TGF- β et développement du système vasculaire

2.2.1 Invalidation de ligand et angiogenèse

L'inactivation de TGF- β 1 donne un phénotype variable en fonction du fond génétique. Ainsi, dans un fond génétique C57BL/6, les embryons meurent d'un défaut préimplantatoire (Kallapur S. 1999). Par contre, dans un fond génétique 129 x NIH/Ola x C57BL/6, 50 % des mutants et 20 % des hétérozygotes meurent à E 10.5 d'un défaut de développement du sac

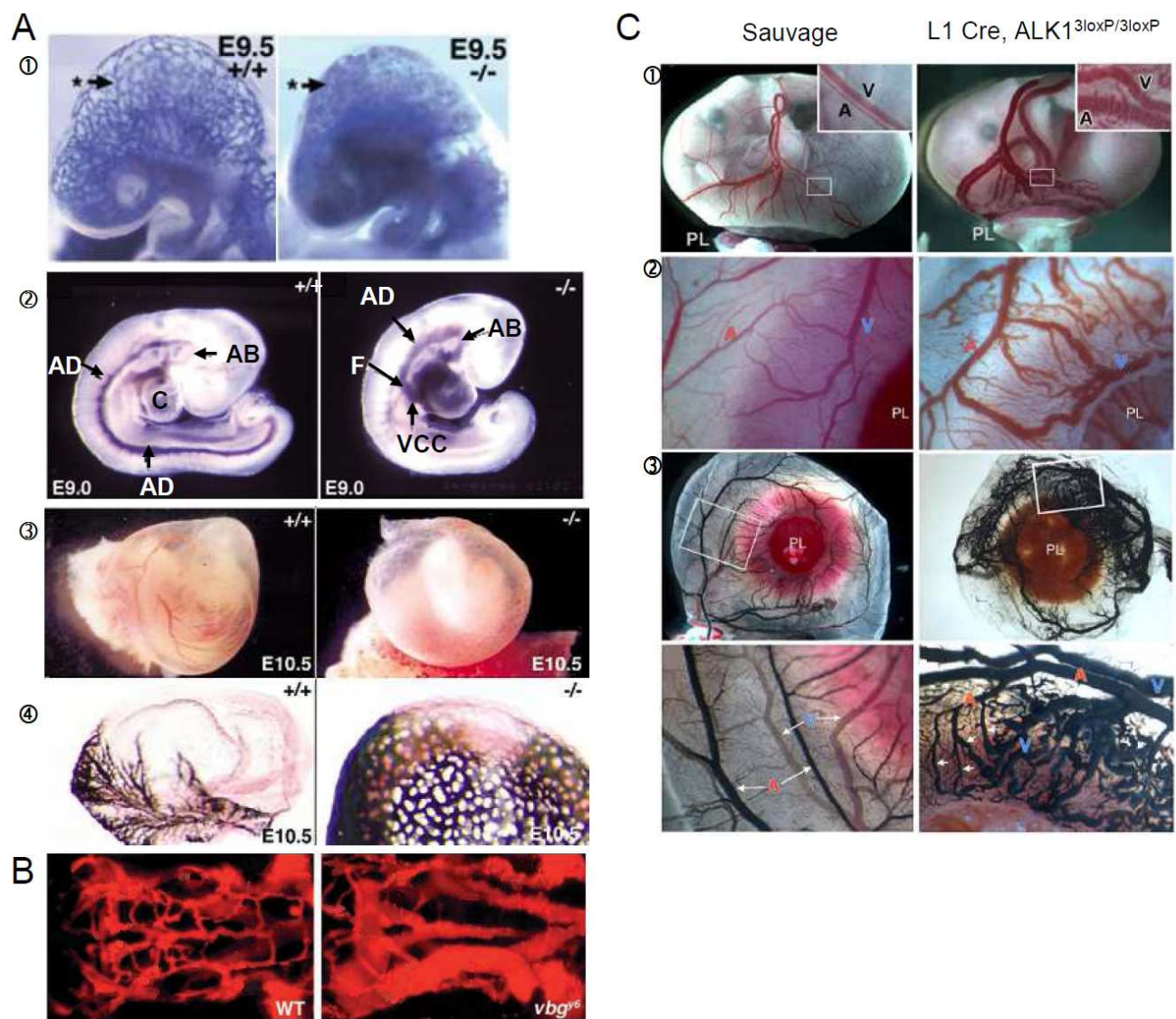


Figure 50 : Phénotype de l'invalidation d'ALK1.

A : Invalidation totale d'ALK1 chez la souris. ① Vascularisation de la tête à E9.5. Les capillaires sont absents dans les souris invalidées. D'après (Oh S. P. 2000). ② AB : Arche Brachiale, AD : Aorte Dorsale, F : Fistule artério-veineuse, VCC : Veine Cardinale Commune, C : Cœur. Injection d'encre dans le cœur d'embryon E 9.0. Les souris invalidées ont une aorte dilatée et une fistule reliant directement l'aorte à la veine cardinale commune. ③ Absence de vaisseaux sanguins dans le sac vitellin d'un embryon à E 10.5. En injectant de l'encre, le plexus vasculaire primitif est visualisable dans le sac vitellin des souris invalidées, ce qui montre que la vasculogenèse n'est pas altérée, mais aucun vaisseau n'est détectable. D'après (Urness L. D. 2000).

B : WT : Sauvage (Wild Type). L'invalidation de vbg chez le poisson zèbre entraîne un défaut de remodelage vasculaire et une dilatation importante des vaisseaux (larve de poisson 5 jours après fécondation). D'après (Roman B. L. 2002).

C : Invalidation d'ALK1 dans les cellules endothéliales (promoteur L1). V : Veine, A : Artère, PL : Placenta. ① Les embryons à E 16.5 invalidés présentent une dilatation importante des veines et des artères dans le sac vitellin. ② Des fistules artério-veineuses sont visibles ③ Injection d'encre qui confirme les fistules et met bien en évidence la tortuosité des vaisseaux. D'après (Park S. O. 2008).

vitellin (Dickson M. C. 1995) (Bonyadi M. 1997). La vasculogenèse et l'hématopoïèse sont très affectées par cette délétion. La différenciation terminale des cellules endothéliales est altérée, et le nombre de globules rouges dans le sac vitellin est très inférieur à la normale, entraînant une anémie. L'embryon n'a initialement aucun défaut, les effets sur son développement étant secondaire à la non mise en place du réseau vasculaire.

Les invalidations des BMPs n'ont pas donné de phénotype vasculaire, peut être suite à une redondance entre les BMPs. Certains embryons invalidés pour BMP4 présentent des défauts dans la formation des îlots sanguins suggérant une implication de BMP4 dans la vasculogenèse (Winnier G. 1995).

2.2.2 Invalidation de récepteur et angiogenèse

L'invalidation d'ALK3 dans les cellules Flk+ (VEGFR2) aboutit à une létalité des embryons autour de E 10.5 suite à quelques malformations cardiaques mais surtout des anomalies vasculaires, dont des défauts dans le remodelage vasculaire et la maturation des vaisseaux ce qui donne des importantes hémorragies abdominales (Park C. 2006). Une autre inactivation conditionnelle d'ALK3 a été réalisée. L'inactivation d'ALK3 dans les cellules de muscle lisse et les cardiomyocytes aboutit à des défauts similaires à l'invalidation dans les cellules Flk+ (El-Bizri N. 2008), ce qui suggère un rôle d'ALK3 plutôt dans les cellules de muscle lisse et les cardiomyocytes que dans les cellules endothéliales.

ALK1 est aussi un récepteur clé dans le déroulement de l'angiogenèse physiologique. Les souris invalidées pour ALK1 meurent autour de E 10.5 suite à des défauts d'angiogenèse (Urness L. D. 2000) (Oh S. P. 2000). Dans ces souris le plexus vasculaire est formé normalement, mais le réseau vasculaire ne peut pas se développer que ce soit dans le sac vitellin ou dans l'embryon (figure 50A). Les embryons invalidés pour ALK1 présentent un retard de croissance, une vascularisation dilatée et immature dans le sac vitellin, un péricarde élargi, des fistules artério-veineuses avec notamment une fusion de l'aorte dorsale et de la veine cardinale (figure 50A). Il y a aussi un recrutement des cellules de muscle lisse défaillant. L'invalidation dans le poisson zèbre du gène équivalent à ALK1 (vbg, violet beauregarde) aboutit aussi à une létalité embryonnaire consécutive à une angiogenèse défaillante (figure 50B) (Roman B. L. 2002). La circulation sanguine ne s'effectue alors que dans un nombre limité de vaisseaux dilatés du crane, suite à une augmentation du nombre de

cellules endothéliales, le corps n'étant pas perfusé. La délétion d'ALK1 dans les cellules endothéliales spécifiquement a été faite en 2008 (Park S. O. 2008). Les auteurs ont exprimé la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur L1 qui est activé après E 10.5 ce qui permet de ne pas interférer avec la formation cardiaque. De plus, l'expression est variable en fonction de l'organe : forte dans les cellules endothéliales des poumons, des intestins, du placenta et du sac vitellin, plus faible dans les cellules endothéliales du cerveau, du cœur et du rein et nulle dans le foie, la peau et les membres. Le phénotype donne des vaisseaux du sac vitellin tortueux, dilatés et un réseau complexe avec des connexions directes anormales entre des veines et des artères (figure 50C). Les vaisseaux du cordon ombilical apparaissent aussi altérés, particulièrement l'artère (figure 50C). Cette invalidation est létale. La délétion inductible d'ALK1 dans les cellules endothéliales a permis d'étudier le rôle d'ALK1 dans la vascularisation adulte (Park S. O. 2009). L'invalidation à l'âge adulte conduit aussi à une létalité par hémorragie dans les deux semaines pour les femelles et trois pour les mâles. Le phénotype complet de cette invalidation ainsi que celui des souris hétérozygotes seront présentés dans la partie consacrée aux modèles murins de la maladie de Rendu-Osler. Pour finir sur les invalidations d'ALK1, l'analyse de la vascularisation de la rétine dans les souris nouveau-nées invalidées pour ALK1 dans les cellules endothéliales conduit à des altérations comparables à celles de l'invalidation de l'endogline avec un phénotype plus marqué (Mahmoud M. 2011). Cette invalidation engendre une létalité des souris dans les 48 h.

L'invalidation d'ALK5 donne un phénotype légèrement différent. En effet, la différenciation des cellules endothéliales apparaît normale. Cependant, un défaut d'angiogenèse aboutit à des vaisseaux très dilatés, et mal recouverts par les cellules de muscle lisse ce qui entraîne une fragilité de ces vaisseaux, d'où la présence d'hémorragies (Larsson J. 2001). Ce phénotype confirme les données *in vitro* du rôle de TGF- β dans la différenciation des cellules mésenchymateuses précurseurs des cellules murales en cellules de muscle lisse ou en péricytes (Hirschi K. K. 1998) (Darland D. C. 2001). Cependant, le rôle de la famille TGF- β dans l'angiogenèse décrit avec l'inactivation d'ALK5 est controversé. Bien que l'équipe qui avait décrit le phénotype des souris invalidées pour ALK5 ait confirmé ces résultats en retrouvant un phénotype semblable avec des souris invalidées pour ALK5 dans les cellules endothéliales uniquement (Carvalho R. L. 2004), une autre équipe montra des résultats opposés (Park S. O. 2008). En effet, l'équipe de Paul Oh a utilisé une souris ALK5 "floxé" dont l'invalidation par la Cre recombinase était conduite par le promoteur L1, déjà décrit précédemment, dérivé du promoteur d'ALK1. L'équipe concurrente avait utilisé le promoteur Tie1 qui permet alors l'expression de la Cre dans toutes les cellules endothéliales, dès un stade

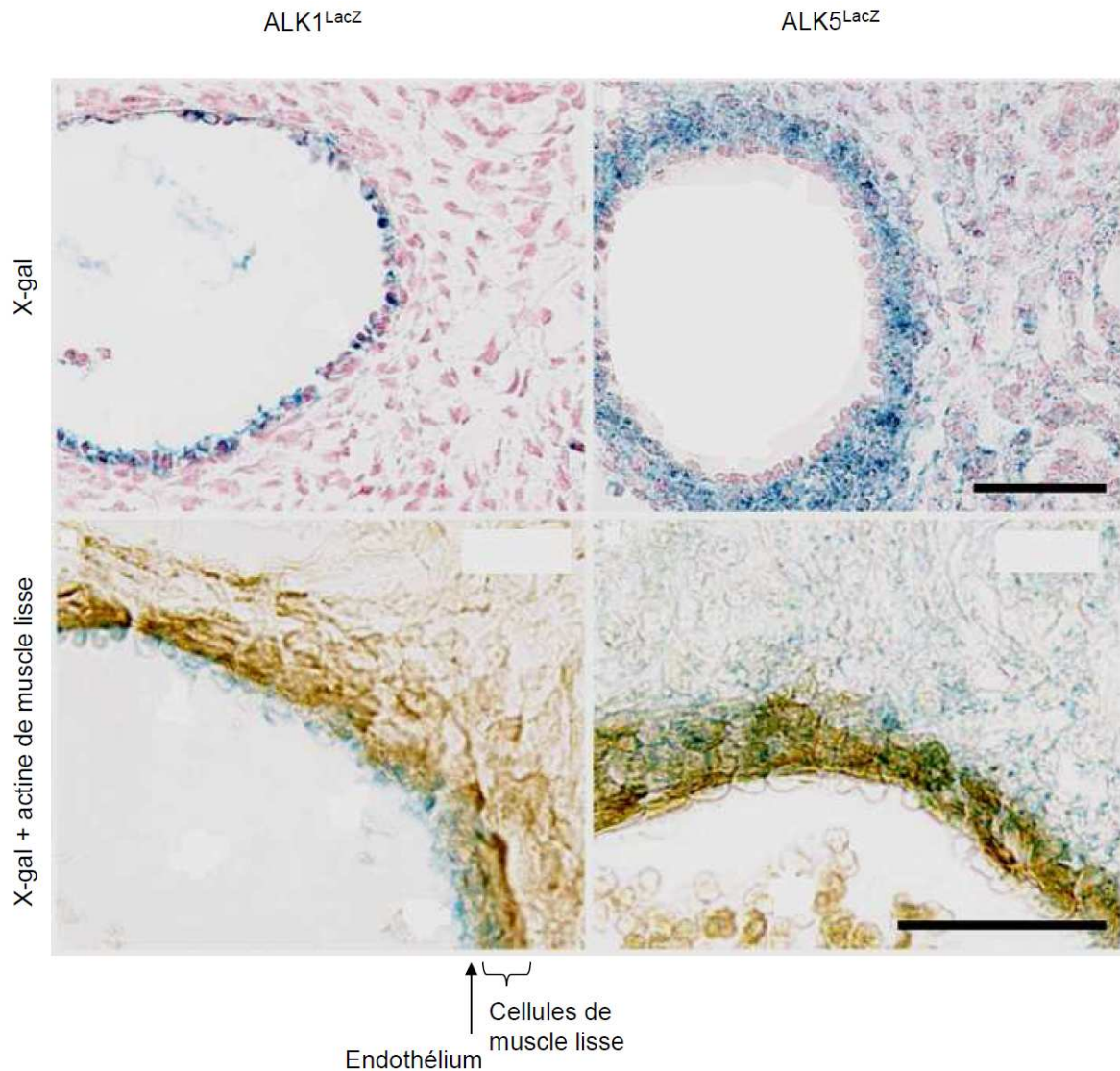


Figure 51 : Site d'expression d'ALK1 et d'ALK5 dans les vaisseaux.

Aorte d'embryon de souris E11.5 exprimant *LacZ* sous le contrôle du promoteur soit d'ALK1 (à gauche) soit d'ALK5 (à droite). Le marquage X-gal révèle en bleu les sites d'expression de β -galactosidase (codée par *LacZ*), le marquage de l'actine de muscle lisse révèle la couche de cellules de muscle lisse. Le marquage bleu dans l'endothélium pour les photographies de gauche, montre une expression d'ALK1 dans les cellules endothéliales, tandis que le marquage bleu dans les photographies de droite se trouve dans les cellules de muscle lisse et montre une expression d'ALK5 dans ces cellules. D'après (Seki T. 2006).

précoce de différenciation. Paul Oh n'a remarqué aucun phénotype dans les souris invalidées ALK5 sous le contrôle du promoteur L1. La différence de phénotypes entre les deux équipes peut s'expliquer par un rôle d'ALK5 dans la vasculogénèse et la différenciation des cellules endothéliales. A ce stade, seules les souris Tie1cre(+); ALK5^{LoxP/LoxP} sont invalidées pour ALK5 dans les cellules endothéliales et leur précurseur. Par contre, ALK5 n'aurait pas de rôle sur l'angiogénèse, c'est-à-dire le développement du réseau vasculaire après la différenciation des cellules endothéliales dans les îlots sanguins du sac vitellin d'où l'absence de phénotype dans les souris L1cre(+); ALK5^{LoxP/LoxP}. Cette théorie est supportée par la non détection par l'équipe de Paul Oh d'ALK5 dans les cellules endothéliales *in vivo* (Seki T. 2006). Utilisant des souris ALK5^{LacZ} et ALK1^{LacZ}, cette équipe a montré une expression d'ALK1 restreinte au niveau des cellules endothéliales, alors qu'ALK5 était exprimé par les cellules de muscle lisse et n'était pas détectable dans l'endothélium (figure 51).

Concernant les récepteurs de type 2, la délétion totale de BMPR2 est létale. En 2007, une souris transgénique surexprimant un shRNA (short hairpin RNA) qui réduit de 70 à 90 % l'expression de BMPR2 a été créée (Liu D. 2007). Cette souris est viable et développe après la naissance des lésions caractérisées par une dilatation des vaisseaux, qui peuvent occasionner des saignements dans le tube digestif et au niveau cutané, ainsi qu'une défaillance dans le recouvrement des vaisseaux par les cellules de muscle lisse. Les invalidations hétérozygotes qui peuvent servir de modèles animaux de l'hypertension artérielle pulmonaire seront présentées ultérieurement.

L'invalidation du récepteur TβR2 donne un phénotype voisin à l'invalidation de TGF-β1, avec un défaut dans le remodelage du plexus vasculaire primitif, dans la différenciation des cellules endothéliales et dans l'hématopoïèse (Oshima M. 1996).

L'invalidation de l'endogline, récepteur de type 3, entraîne une mortalité embryonnaire suite à des défauts vasculaires très importants. Les défauts dans la vascularisation du sac vitellin et de l'embryon ainsi que dans le recouvrement par les cellules de muscle lisse ressemblent à ceux rencontrés lors de l'invalidation d'ALK1 (Bourdeau A. 1999) (Li D. Y. 1999) (Arthur H. M. 2000), avec cependant quelques différences (figure 52A - C). Une étude compare précisément les souris invalidées pour ALK1 et l'endogline (Sorensen L. K. 2003). Bien que les défauts vasculaires entre les deux invalidations soient très proches, la dilatation des vaisseaux décrite pour l'invalidation d'ALK1 n'est pas visible pour l'invalidation de l'endogline. Le marqueur artériel EphrineB2 est moins exprimé dans les souris invalidées

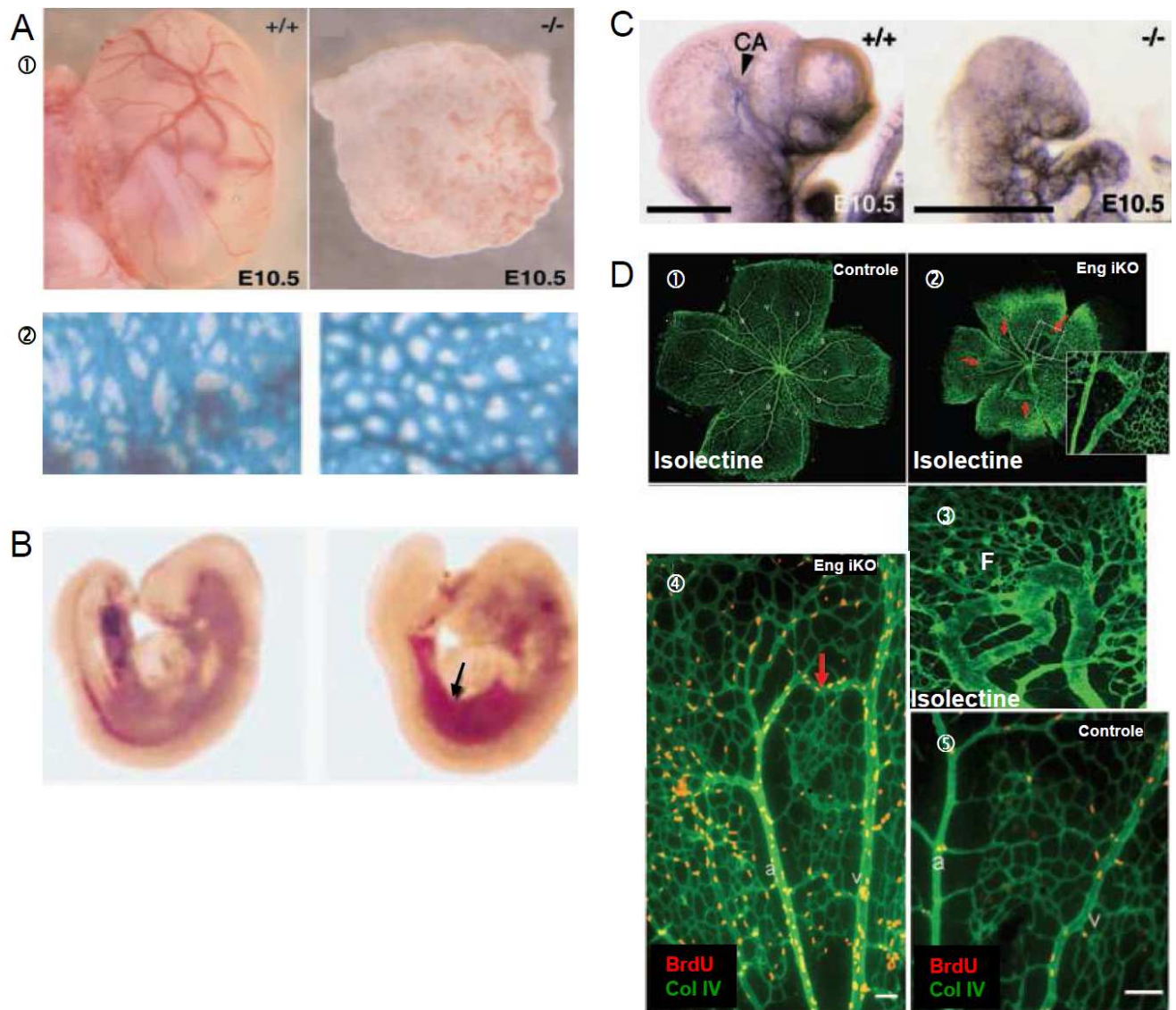


Figure 52 : Phénotype de l'invalidation de l'endogline.

A : ① Le sac vitellin des souris invalidées ne présentent pas de vaisseaux sanguins. D'après (Li D. Y. 1999). ② Visualisation de la vascularisation des sacs vitellins à E 9.0. Les souris sauvages présentent des vaisseaux, tandis que les souris invalidées présentent un plexus vasculaire primitif sans remodelage. Les souris invalidées ont donc des défauts d'angiogenèse mais pas de vasculogenèse. D'après (Bourdeau A. 1999).

B : Présence d'hémorragies internes (flèche) dans les embryons invalidés à E 9.0. D'après (Bourdeau A. 1999).

C : Marquage CD31 sur des embryons E 10.5. Le remodelage du plexus capillaire cérébral échoue dans les souris invalidées. L'artère carotide (CA) est atrétique dans les souris invalidées. D'après (Li D. Y. 1999).

D : ① ② ③ Invalidation de l'endogline dans les souris endothéliales après la naissance. Visualisation de la vascularisation de la rétine à P7. La vascularisation dans les souris invalidées présente un retard et des fistules artério-veineuses (F et flèches rouges). ④ ⑤ Les cellules endothéliales invalidées pour l'endogline ont un taux de prolifération (marquage BrdU rouge) plus important que les cellules sauvages. D'après (Mahmoud M. 2010).

ALK1 que dans les sauvages, alors qu'aucune dérégulation n'est visible dans les souris invalidées pour l'endogline (figure 64B). Les auteurs n'ont pas vu d'affectation des différents ligands et récepteurs de la voie Notch, connue pour son rôle dans la différenciation artério-veineuse, dans aucune des deux invalidations. Dans une étude récente, l'invalidation inductible de l'endogline dans les cellules endothéliales après la naissance a permis de mieux comprendre l'implication de l'endogline dans l'angiogenèse. L'invalidation de l'endogline dans les premiers jours après la naissance altère l'angiogenèse de la rétine (figure 52D) (Mahmoud M. 2010). Ainsi, ces souris présentent une angiogenèse totalement anormale avec un défaut dans la migration des cellules endothéliales, une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, aboutissant ainsi à une surface de la rétine vascularisée moins développée que dans les souris contrôles mais qui présentent une plus grande densité de vaisseaux. Des jonctions directes artério-veineuses sont aussi observées, faisant penser au phénotype de la maladie de Rendu-Osler. Les souris hétérozygotes seront présentées dans les modèles animaux de la maladie de Rendu-Osler.

L'invalidation de bétaglycan entraîne une létalité embryonnaire à E 14.5 consécutive à des défauts cardiaques et hépatiques (Stenvers K. L. 2003). Les vaisseaux coronaires sont peu nombreux et peu développés, ce qui entraîne la défaillance cardiaque fatale (Compton L. A. 2007).

2.2.3 Invalidation de la voie Smad et angiogenèse

L'invalidation de Smad5 donne un phénotype vasculaire, avec un phénotype proche de celui de l'invalidation d'ALK1 et de l'endogline (figure 53A) (Chang H. 1999) (Yang X. 1999). De manière surprenante, les invalidations de Smad5 dans les cellules endothéliales ou dans les cellules de muscle lisse ne donnent pas de phénotype vasculaire et les souris sont vivantes (Umans L. 2007). Une invalidation partielle de Smad5 peut expliquer ce résultat ou une compensation des autres Smads (notamment Smad1 ou Smad8). La délétion spécifique de Smad4 dans les cellules endothéliales entraîne une mortalité des embryons à E 10.5 suite à des défauts cardiovasculaires, notamment une diminution du bourgeonnement des vaisseaux et du remodelage vasculaire (Lan Y. 2007). L'invalidation de Smad1 donne des défauts mineurs de l'angiogenèse du sac vitellin (Lechleider R. J. 2001), celle de Smad6 donne sur quelques souris (viabiles) des défauts cardiaques, une calcification vasculaire et une hypertension systémique (Galvin K. M. 2000). Enfin, l'invalidation de Smad8 est viable mais

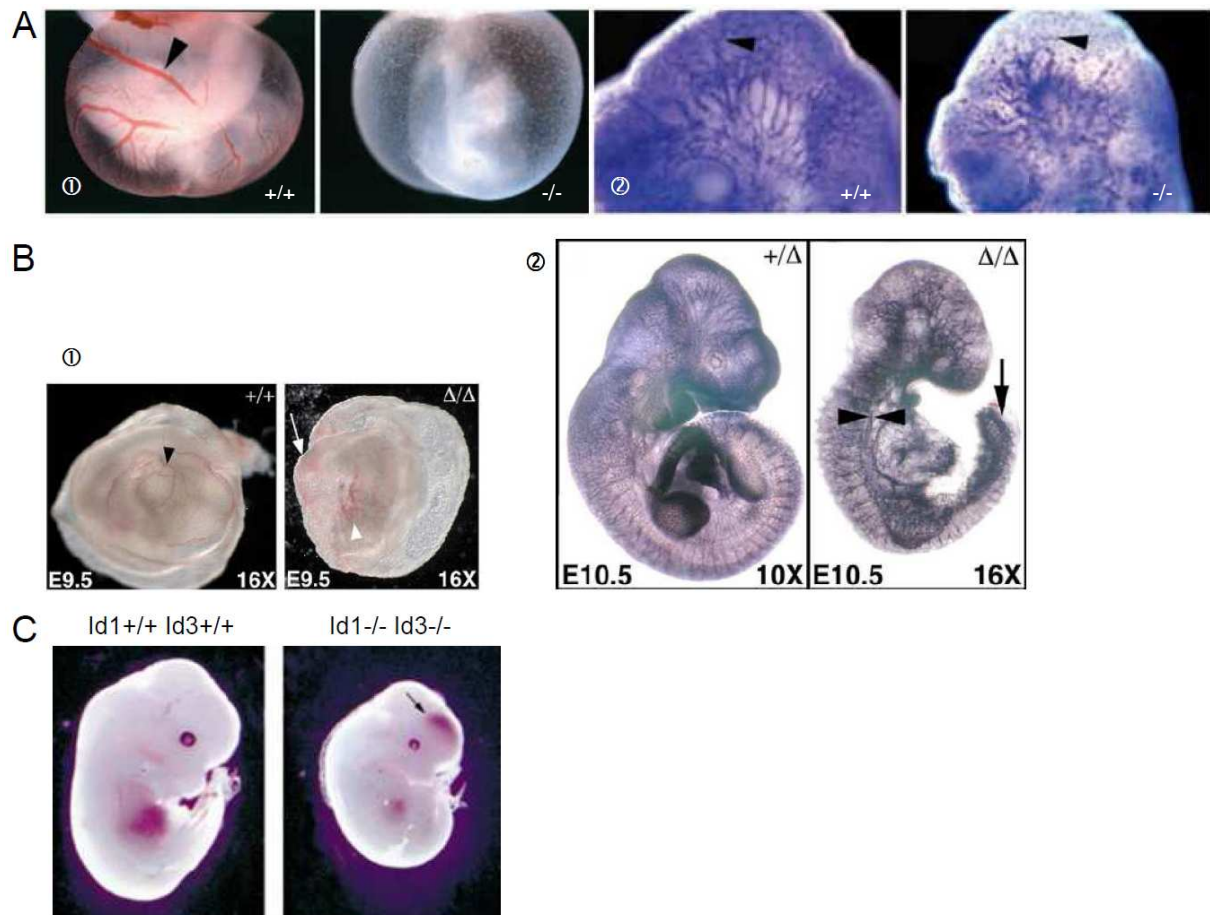


Figure 53 : Phénotype vasculaire de l'invalidation de gènes impliqués dans la signalisation de la famille TGF- β .

A : Invalidation de Smad5. ① Les vaisseaux sanguins du sac vitellin (pointe) sont absents dans le sac des souris invalidées à E 9.5. ② Arbre vasculaire cérébral normal (pointe à gauche) et déstructuré dans les souris invalidées (pointe à droite). D'après (Yang X. 1999).

B : Invalidation de TAK1. ① Le sac vitellin des souris invalidées à E 9.5 ne présente pas de vaisseaux, seul le plexus vasculaire primitif est formé. ② La vascularisation de l'embryon invalidé à E10.5 est déstructurée. L'aorte dorsale est collapsée à plusieurs endroits (flèche et pointes). D'après (Jadrich J. L. 2006).

C : Invalidation d'Id1 et Id3. Les embryons invalidés pour les deux gènes présentent des hémorragies cérébrales à E 12.5. D'après (Lyden D. 1999).

conduit à un remodelage spontané de la vascularisation pulmonaire (Huang Z. 2009). La double invalidation de Smad1 et Smad5 dans les cellules endothéliales présentée lors du dernier congrès sur les BMPs montre que la voie Notch et la voie Smad interagissent entre-elles, cette double invalidation aboutissant à un dérèglement des phénotypes "stalk cell" et "tip cell" (Moya I. 2010).

2.2.4 Invalidation de TAK1 et angiogenèse

TAK1 a été présentée dans les voies Smad-indépendantes en réponse à TGF- β ou aux BMPs. L'invalidation de TAK1 conduit à un phénotype en tout point semblable à l'inactivation d'ALK1 que ce soit chez la souris ou chez le poisson zèbre ([figure 53B](#)) (Jadrich J. L. 2006). L'invalidation d'ALK1 et de TAK1 dans le poisson zèbre donne des défauts angiogéniques encore plus prononcés. Par contre l'injection d'ARNm de TAK1 pour sa surexpression dans un poisson zèbre invalidé pour ALK1 restaure partiellement un phénotype normal (Jadrich J. L. 2006). Aucun lien direct entre ALK1 et TAK1 n'a à ce jour été décrit.

2.2.5 Invalidation d'Id1 et d'Id3 et angiogenèse

Les Inhibiteurs de la différenciation (Id) 1 et 3 sont des facteurs de transcription hélice boucle hélice induits fortement par les BMPs via la voie Smad (Korchynskyi O. 2002). L'invalidation de trois des quatres allèles de ces deux gènes ne donnent pas de phénotype. La double invalidation de ces deux gènes donnent un phénotype léthal à E 13.5 avec notamment des défauts d'angiogenèse (vaisseaux dilatés, hémorragies craniales) ([figure 53C](#)) (Lyden D. 1999).

3. ALK1, Endogline et BMP9/BMP10 : un trio sanguin !

Je vais dans cette partie me focaliser sur un récepteur, à savoir ALK1. Cette partie sera consacrée à la présentation du complexe de signalisation d'ALK1.

L'étude de deux maladies vasculaires, la maladie de Rendu-Osler et l'hypertension artérielle pulmonaire, a permis de pressentir le complexe de récepteur pour la signalisation d'ALK1. En effet, le fait que la maladie de Rendu-Osler soit causée par des mutations d'*ACVRL1* ou de l'*Endogline* tend à prouver que ces deux récepteurs fonctionnent dans un même complexe de récepteurs. De plus, l'hypertension artérielle pulmonaire familiale est causée par des mutations d'*ACVRL1* ou de *BMPR2*, ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs. Je vais décrire ici les étapes de la découverte du complexe de signalisation d'ALK1.

3.1 Le récepteur ALK1

3.1.1 Historique et site d'expression d'ALK1

ALK1 fut cloné en 1993 à partir du tractus urogénital d'un embryon de rat et désigné sous le nom de SKR-3 (Serine/threonine-Kinase Receptor 3) (He W. W. 1993). La même année, ALK1 humain, également appelé TSR-1 (TGF- β Superfamily Receptor-type 1), fut cloné par deux équipes (Attisano L. 1993) (ten Dijke P. 1993). En 1996, Panchenko et collaborateurs ont découvert la particularité d'ALK1 à savoir son expression restreinte aux cellules endothéliales (Panchenko M. P. 1996). Une première étude par northern blot a démontré l'expression très forte d'ALK1 dans les poumons du rat. Mais c'est grâce à une hybridation *in situ* que cette équipe a pu mettre en évidence l'expression d'ALK1 dans les vaisseaux sanguins (ceux des poumons, mais aussi l'aorte, la veine cave et des vaisseaux d'autres organes), et plus précisément dans les cellules endothéliales. C'est aussi en 1996 que des mutations du gène *ACVRL1* ont été reconnues comme responsables de la maladie de Rendu-Osler de type 2 (Johnson D. W. 1996). L'implication d'ALK1 dans cette maladie vasculaire et son expression restreinte aux cellules endothéliales ont fait alors d'ALK1 un récepteur de grande importance pour l'étude du système vasculaire. Un an plus tard, en 1997,

une étude plus précise a permis d'étudier l'expression d'ALK1 au cours du développement de l'embryon de souris (Roelen B. A. 1997). Ainsi, par RT-PCR et hybridation *in situ*, ALK1 a été détecté dès E 6.5. Entre E 7.5 et 8.5, les sites d'expression d'ALK1 coïncident avec ceux de la vasculogenèse et dans les trophoblastes (Roelen B. A. 1997). Au stade E 9.5 à 12.5, ALK1 est présent dans l'endothélium vasculaire de nombreux organes et tissus.

Quelques études ont montré une expression d'ALK1 en dehors du système vasculaire. Ainsi ALK1 a été détecté dans la pulpe des dents chez le rat (Toyono T. 1997), dans l'épithélium conjonctif de la cornée et de l'iris, dans les kératynocytes (Obata H. 1999), dans les cellules de l'épiderme (Beger B. 2006), dans le système nerveux central (Lopez-Coviella I. 2006) et dans les chondrocytes (Finsson K. W. 2008). Cependant, ces études sont souvent basées sur des détections par RT-PCR, sans détection de la protéine (les anticorps anti ALK1 étant peu fiables). Une confirmation de ces sites semble donc être nécessaire.

3.1.2 Complexe de signalisation d'ALK1

L'étude de la signalisation d'ALK1 se compose principalement en deux parties : la découverte des R-Smads activées par ALK1 et la recherche du ou des ligand(s) d'ALK1.

Dès 1998 les R-Smads phosphorylées par ALK1 ont été découvertes : il s'agit des Smad1/5/8 (Macias-Silva M. 1998). L'étude a été réalisée par transfection de Cos-1, cellules n'exprimant pas d'ALK1 endogène, avec une forme constitutivement active d'ALK1 (forme mutée avec remplacement de la glutamine 201 par un résidu d'acide aspartique qui mime ainsi la phosphorylation des récepteurs de type 2 sur ALK1). ALK1 active donc la voie dite des BMPs, au même titre qu'ALK2/3/6. Une étude récente a montré la possibilité pour ALK1 de phosphoryler Smad2 mais pas Smad3, de manière faible et transitoire (Upton P. D. 2009).

La recherche du ligand d'ALK1 fut plus difficile et débattue. Lors du clonage d'ALK1 humain, les tests de liaisons du TGF- β et de l'activine-A marqués à l'iode 125 montrent une liaison de ces cytokines sur ALK1 surexprimé dans des Cos-1 en présence des récepteurs de type 2 (respectivement T β R2 et ActR2), bien que faible par rapport à ALK5 pour TGF- β et à ALK2 et ALK4 pour l'activine-A (Attisano L. 1993) (ten Dijke P. 1994). Ces deux cytokines sont dans un premier temps considérées comme les ligands d'ALK1. Cependant, les tests cellulaires fonctionnels montrent que les effets du TGF- β ne sont pas restaurés, dans des

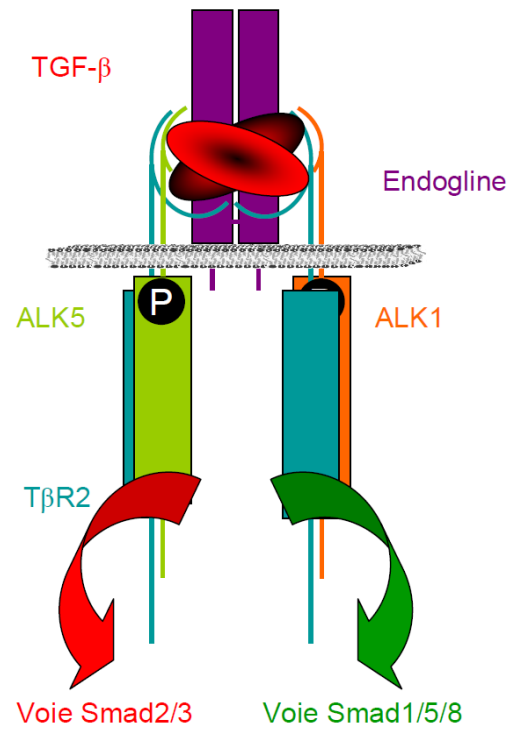


Figure 54 : Modèle de signalisation d'ALK1 avec TGF-β comme ligand.

TGF-β se lie sur un complexe dont les récepteurs de type 1 sont ALK1 et ALK5. L'endogline est indispensable à la formation du complexe.

cellules déficientes en ALK5, par ALK1 et qu'ALK1 ne donne pas les réponses transcriptionnelles de l'activine (Attisano L. 1993) (ten Dijke P. 1994). De plus, le TGF- β endogène ne lie pas ALK1 sur les cellules d'aorte porcine (ten Dijke P. 1994). Andreas Lux compliqua la donne en 1999 en confirmant la liaison de TGF- β 1 et TGF- β 3 ainsi que de l'activine-A sur ALK1 mais en montrant qu'un ligand présent dans le sérum n'était pas inhibé par un anticorps anti-TGF- β ou par l'inhibine (Lux A. 1999). Cette étude marque une étape importante dans la compréhension de la signalisation d'ALK1. En effet, la réalisation de récepteur chimérique avec le domaine extracellulaire d'ALK1 et le domaine intracellulaire d'ALK5 permet de montrer qu'un tel récepteur est capable d'activer la voie Smad2/3 en réponse à TGF- β 1, TGF- β 3 et du sérum humain. L'utilisation d'un anticorps anti-TGF- β ne permet pas d'inhiber l'action du sérum suggérant un ligand différent de TGF- β dans le sérum. L'utilisation d'ALK1 sauvage ou constitutivement actif (Q201D) ne permet pas la phosphorylation de Smad2/3. La voie de signalisation d'ALK1 ne semble pas être la voie Smad du TGF- β . Deux groupes réalisent en 2000 des immunoprécipitations après réticulation de TGF- β radiomarqué sur des HUVECs (Human Umbelical Vein Endothelial Cells). Alors que ces équipes utilisent le même anticorps dirigé contre ALK1, leur conclusion sur la capacité d'ALK1 à lier TGF- β diffère (Oh S. P. 2000) (Abdalla S. A. 2000).

C'est en 2002 que le groupe de Peter Ten Dijke propose le premier modèle de signalisation pour ALK1 (Goumans M. J. 2002). En utilisant des MEECs (Mouse Embryonic Endothelial Cells) et des BAECs (Bovine Aortic Endothelial Cells), les auteurs montrent que TGF- β peut phosphoryler les deux voies Smad : la voie dite TGF- β (Smad2/3) et la voie dite BMP (Smad1/5/8). En utilisant des oligonucléotides ciblant spécifiquement ALK1 ou ALK5, ils démontrent qu'ALK5 est indispensable à la phosphorylation des deux voies Smad alors que l'extinction d'ALK1 n'a d'effet que sur la phosphorylation des Smads de la voie BMP et que cette phosphorylation n'est pas totalement abolie lors de cette extinction. Les auteurs proposent alors un modèle où ALK1 et ALK5 interagissent. Ce modèle sera affiné en 2003, avec la publication par cette même équipe de la nécessité de l'activité kinase d'ALK5 pour la réponse à TGF- β dans des cellules endothéliales (Goumans M. J. 2003). Ils proposent alors que TGF- β 1 et TGF- β 3 lient un complexe comportant deux récepteurs T β R2, un récepteur ALK5 et un récepteur ALK1 (figure 54). ALK1 dans ce complexe serait alors activé et phosphorylerait Smad1/5/8. En 2004, la même équipe complète le modèle en démontrant le rôle indispensable de l'endogline (Lebrin F. 2004). En effet, en absence d'endogline seules les Smad2/3 sont phosphorylées en réponse à TGF- β 3 via le complexe TGF- β /ALK5/T β R2. Cependant la phosphorylation de Smad1/5/8 par TGF- β a été décrite comme très transitoire

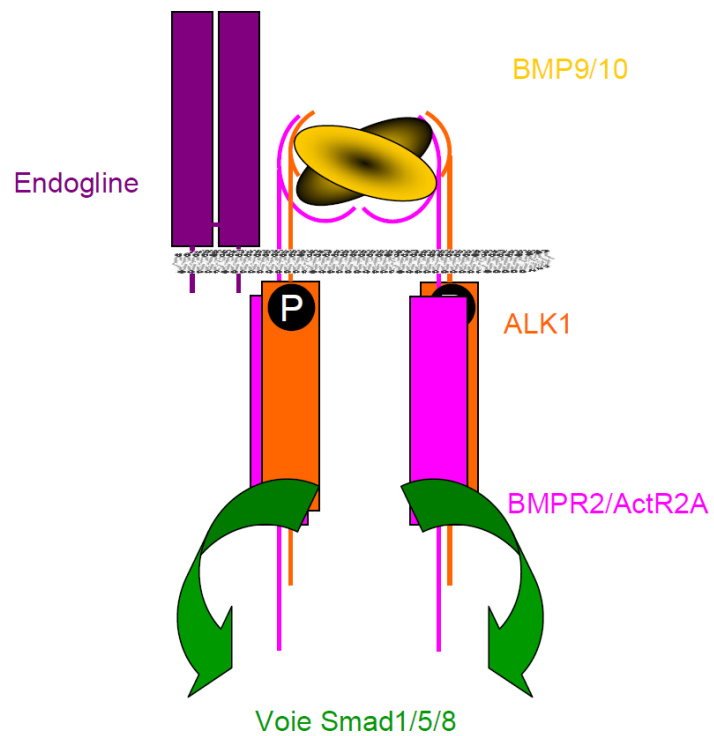


Figure 55 : Modèle de signalisation d'ALK1 avec BMP9/BMP10 comme ligand.

BMP9 se lie sur un complexe dont les récepteurs de type 1 sont deux monomères d'ALK1. L'endogline n'est pas indispensable à la formation de ce complexe.

(une heure), ce qui s'oppose aux phosphorylations de Smad2/3 par TGF- β ou de Smad1/5/8 par les BMPs (Goumans M. J. 2002) (Valdimarsdottir G. 2002). L'équipe de P. Ten Dijke expliquent cette particularité en 2006, en montrant que TGF- β 1 induit Smad7 qui recrute alors la phosphatase PP1 α (Valdimarsdottir G. 2006).

Bien que TGF- β soit décrit comme le ligand d'ALK1 depuis sa découverte, plusieurs zones d'ombre restaient au tableau jusqu'à récemment. En effet, T β R2 est indispensable dans le modèle de P. Ten Dijke car il est le seul récepteur à pouvoir lier TGF- β avec une grande affinité. Cependant, aucune interaction entre ce récepteur et ALK1 n'a été démontrée. De plus, l'inhibiteur d'ALK5 (SB-431542) inhibe la signalisation TGF- β sur les deux voies Smad (Goumans M. J. 2003). Or ce composé n'inhibe pas ALK1. Ainsi, en suivant le modèle décrit, soit ALK5 phosphoryle directement à la fois les Smads de la voie TGF- β et les Smads de la voie BMP, soit ALK5 phosphoryle et active ALK1 (hypothèse avancée par les auteurs (Goumans M. J. 2003)). Des travaux ultérieurs démontrent qu'en fait ALK5 peut phosphoryler les deux voies Smad (Liu I. M. 2009) (Wrighton K. H. 2009b). De plus, la géométrie des complexes des récepteurs rend peut probable la phosphorylation d'un récepteur de type 1 par un autre récepteur du type 1 ([figure 72](#)). Enfin les travaux de Seki qui ont montré l'expression d'ALK1 dans les cellules endothéliales et d'ALK5 dans les cellules de muscle lisse (travaux présentés précédemment) tendent à contredire la possibilité d'une interaction entre ALK5 et ALK1 *in vivo* (Seki T. 2006). Le groupe de P. Oh a décrit un phénotype vasculaire fort pour les souris invalidées ALK1 suite à l'expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur L1, alors que l'invalidation d'ALK5 par le même promoteur n'induit aucun phénotype (Park S. O. 2008). Rappelons aussi que Lux avait prouvé l'existence d'un ligand dans le plasma différent de TGF- β (Lux A. 1999). Tous ces éléments poussent à penser que TGF- β n'est pas le ligand physiologique d'ALK1 et qu'un autre modèle doit être proposé. En 2005, une étude en résonnance plasmonique de surface montre qu'ALK1 immobilisé ainsi que BMPR2 immobilisé peuvent lier BMP9 (Brown M. A. 2005).

C'est en 2007 que deux autres ligands proches sont découverts : BMP9 et BMP10 (David L. 2007a) (Scharpfenecker M. 2007). Dès lors, un autre modèle est proposé où un dimère d'ALK1 et un dimère de BMPR2 ou d'ActR-2A lient BMP9 ou BMP10 ([figure 55](#)). L'endogline est montrée comme activatrice sur ce complexe, sans être indispensable. En 2008, BMP9 est décrite comme une cytokine circulante et un anticorps neutralisant BMP9 éteint

totale la stimulation d'ALK1 par le sérum (David L. 2008). Le ligand pressenti par Lux se révèle donc être BMP9.

Notons enfin que la VE-cadherine, protéine de jonction des cellules endothéliales, joue un rôle dans l'interaction entre les récepteurs de la famille TGF- β , augmentant ainsi la signalisation d'ALK1 (Rudini N. 2008).

3.1.3 Effets cellulaires d'ALK1

Les fonctions biologiques d'ALK1 sont controversées et l'absence jusqu'en 2007 d'un ligand spécifique a rendu ces études difficiles. TGF- β 1 et TGF- β 3 ne permettent pas d'étudier spécifiquement les effets d'ALK1 puisqu'ils activent fortement ALK5.

La surexpression d'une forme constitutivement active (notée ALK1ca) dans des cellules endothéliales a été couramment employée. En 2002, Ota et collaborateurs ont montré que la surexpression dans les HUVECs d'ALK1ca inhibait légèrement leur prolifération et avait peu d'effet sur leur organisation en tubules sur une matrice de collagène (Ota T. 2002). La même année, Lamouille et collaborateurs ont montré sur diverses lignées cellulaires (HMVECd : Human MicroVascular Endothelial Cell from the dermis ; HMVECl : Human MicroVascular Endothelial Cell from lungs ; HUVECs ; HMEC-1 : Human Microvascular Endothelial Cell, lignée cellulaire immortalisée) que la surexpression d'ALK1ca inhibait la migration et la prolifération de ces cellules (Lamouille S. 2002). Koleva et collègues ont aussi obtenu une baisse de la prolifération des HUVECs en surexprimant ALK1ca, en mettant en avant une diminution de l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire lors de cette surexpression (Koleva R. I. 2006). A l'inverse le groupe de Peter ten Dijke a publié une stimulation de la migration de MEECs et de la prolifération de BAECs lors de la surexpression d'ALK1ca (Goumans M. J. 2002). Il semble donc que l'effet d'ALK1 soit très dépendant de la lignée cellulaire utilisée (cellules immortalisées ou primaires, conditions de culture).

Une stratégie inverse a été suivie par David et collaborateurs en inhibant par siRNA ALK1 dans des cellules HMVECd. Il en résulte une augmentation de la migration de ces cellules endothéliales (David L. 2007b). Cet effet est Smad indépendant et passerait par les MAPKs (JNK et Erk). Les autres BMPs (BMP2/4/6/7 cf. Implication d'autres membres dans l'angiogenèse) induisent la migration des cellules endothéliales via l'expression

Smad-dépendante d'Id1 (Valdimarsdottir G. 2002). L'inhibition de la migration des cellules endothéliales Smad-indépendante est donc une particularité du récepteur ALK1 par rapport aux autres récepteurs des BMPs des cellules endothéliales. Une étude comparant les effets de la surexpression d'ALK1 et de l'inhibition d'ALK1 par siRNA dans des cellules endothéliales de capillaires de rétines humaines a montré une diminution de la migration et de la prolifération des cellules surexprimant ALK1 couplée à une diminution des structures tubulaires formées sur du Matrigel (Li B. 2008). La protéine CK2 β (Casein Kinase 2 β) interagit avec ALK1 et serait impliquer dans l'inhibition de la migration des cellules endothéliales (Lee N. Y. 2009). Les auteurs montrent un rôle primordial de CK2 β dans l'induction de la voie Smad1/5/8 par ALK1, sans donner de mécanisme d'action. L'influence de la CK2 β dans les autres voies impliquées dans l'inhibition de la migration (JNK et Erk) n'est pas étudiée.

En 2005, un test *in vivo* avec surexpression d'ALK1 dans le test d'angiogenèse de la cornée de la souris à montrer un effet inhibiteur d'ALK1 sur l'angiogenèse induite par FGF2 (Albe E. 2005).

Une étude portant sur des tumeurs pancréatiques montre une expression d'ALK1 dans les carcinomes pancréatiques (Ungefroren H. 2007). Sans révéler le ligand pouvant activer ALK1 dans ces carcinomes, les auteurs montrent un rôle anti-prolifératif d'ALK1 sur ces cellules cancéreuses.

3.1.4 Régulateurs de l'expression d'ALK1

Plusieurs facteurs, physiques et biochimiques, ont une influence sur le taux d'ALK1 en régulant sa transcription.

Parmi les facteurs physiques, le flux sanguin a été décrit comme nécessaire à l'expression d'ALK1. Des progéniteurs de cellules endothéliales en culture sur lesquelles un flux est appliqué expriment des marqueurs artériels et ont une forte augmentation du taux d'ALK1 (Obi S. 2009). Une étude *in vivo* dans le poisson zèbre a confirmé le rôle du flux dans l'expression d'ALK1 (Corti P. 2011). L'absence de flux par arrêt des battements cardiaques rend l'expression d'ALK1 indétectable par hybridation *in situ*.

L'hypoxie est aussi un facteur qui influence le niveau de transcription d'ALK1. Ainsi, les cellules endothéliales pulmonaires de rat soumises à une hypoxie pendant 15 jours ont une

diminution de l'expression de BMP2 mais une augmentation de celle d'ALK1 (Takahashi K. 2007). Un autre groupe confirma la surexpression d'ALK1 dans des cellules endothéliales soumises à l'hypoxie et montra aussi une surexpression de l'endogline dans ces conditions (Tian F. 2010).

Dans le syndrome d'hyperplasie du cœur droit, l'expression d'ALK1 au niveau du ventricule droit serait doublée par rapport à son expression dans un cœur sain. Cependant ce résultat est à prendre avec précaution car les auteurs trouvent en PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative un grand nombre de gènes dérégulés, comme BMP9 (qui sera décrite dans la partie 3.3), avec une expression qui serait triplée dans le ventricule gauche des cœurs atteints de ce syndrome. Or, BMP9 n'est pas détectée d'après nos données ainsi que celle de la littérature dans le cœur sain (Bidart M. 2011). Les liens de causes à effets de ces expressions différentielles dans ce syndrome n'ont pas été mis à jour.

Concernant les facteurs biochimiques de régulation de l'expression d'ALK1, BMP2 et BMP4 régulent de manière dose dépendante (effet en cloche) l'expression d'ALK1 dans les cellules endothéliales (Yao Y. 2006).

Les lipoprotéines de haute densité (HDL pour High Density Lipoproteins) augmentent l'expression d'ALK1 sur des cellules endothéliales en culture. Cette induction est indirecte et résulte de l'augmentation d'ALK2 par les HDL et de la stimulation d'ALK2 ainsi surexprimé par BMP4. Le glucose augmente aussi l'expression de BMP2 et BMP4 par des cellules endothéliales aortiques et augmente par conséquent ALK1 (Bostrom K. I. 2011).

L'étude du promoteur d'ALK1 a mis à jour plusieurs régulateurs potentiels. Parmi eux, Sp1 (Specificity Protein 1), un facteur de transcription, possède quatorze sites de fixations putatifs dans la séquence du promoteur d'ALK1 et a été montré comme le facteur clé dans le niveau basal d'expression d'ALK1 (Garrido-Martin E. M. 2010). Sp1 régule aussi le niveau basal de l'endogline (Botella L. M. 2001). Cette régulation basale pourrait aussi se faire via le facteur de transcription KLF6 (Kruppel-Like Family 6) (Garrido-Martin E. M. 2010) (Botella L. M. 2002). Trois séquences pour la fixation de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) ont aussi été décrites, ce qui corrèle avec l'effet de l'hypoxie sur l'expression d'ALK1 (Garrido-Martin E. M. 2010). De plus HIF-1 α régule l'expression de l'endogline (Sanchez-Elsner T. 2002). Des sites pour les facteurs de transcription AP1 (Activator Protein 1) et NF κ B (Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) suggèrent aussi une régulation d'ALK1 par des cytokines de l'inflammation (Garrido-Martin E. M. 2010).

Un rapport de cas montre que l'immunosuppresseur FK506 donné à un patient ayant subi une transplantation hépatique augmente le taux d'endogline et d'ALK1 (Albinana V. 2011). Le Raloxifène, modulateur des récepteurs aux oestrogènes, augmente aussi le taux d'ALK1 et d'endogline sur des cellules endothéliales en culture (Albinana V. 2010).

Enfin, ALK1 a été montré plus exprimé dans la vascularisation des rétines *Dll4* +/- par rapport aux sauvages (del Toro R. 2010). L'augmentation du nombre de "tip cells" dans les rétines des souris hétérozygotes suggère qu'ALK1 soit fortement exprimé dans les "tip cells".

3.2 L'endogline, co-récepteur impliqué dans la signalisation ALK1

3.2.1 *Historique et sites d'expression de l'endogline*

L'endogline (également appelée CD105) fut initialement identifiée par un anticorps monoclonal (44G4) dirigé contre une lignée cellulaire pré-lymphoblastique B (Quackenbush E. J. 1985). Le clonage de l'endogline a eu lieu en 1990, ce qui a permis de caractériser l'endogline en tant que glycoprotéine transmembranaire (Gougos A. 1990).

La localisation de l'endogline sur les cellules endothéliales fut mise en évidence en 1986 soit un an après son identification (Quackenbush E. J. 1986), et confirmée en 1988 (Gougos A. 1988). Des études plus poussées ont permis de montrer une expression de l'endogline dans les cellules endothéliales des vaisseaux du sac vitellin, de l'aorte dorsale, et du tube cardiaque primitif entre E 7.5 et E 8.5. Entre E 9.5 et E 13.5, l'expression est retrouvée dans les cellules endothéliales de l'embryon (Jonker L. 2002). Lors de l'embryogenèse humaine, l'endogline est exprimée dans l'endothélium vasculaire entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine de la grossesse (Qu R. 1998), ainsi que dans les syncytiotrophoblastes (Gougos A. 1992). A l'âge adulte, l'endothélium microvasculaire exprime fortement l'endogline (Wong S. H. 2000). L'expression de l'endogline est hétérogène dans l'endothélium vasculaire. Ainsi, l'expression de l'endogline est forte dans les endothéliums soumis à une angiogenèse active, comme lors d'une situation d'ischémie, d'une réponse inflammatoire ou encore lors de la croissance tumorale (Burrows F. J. 1995) (Szekanecz Z. 1995) (Duff S. E. 2003). De plus, dans une situation basale, l'endogline n'a pas une expression uniforme à l'intérieur même des organes, comme ce fut démontré pour le foie (Sawabe M. 2001) ou le

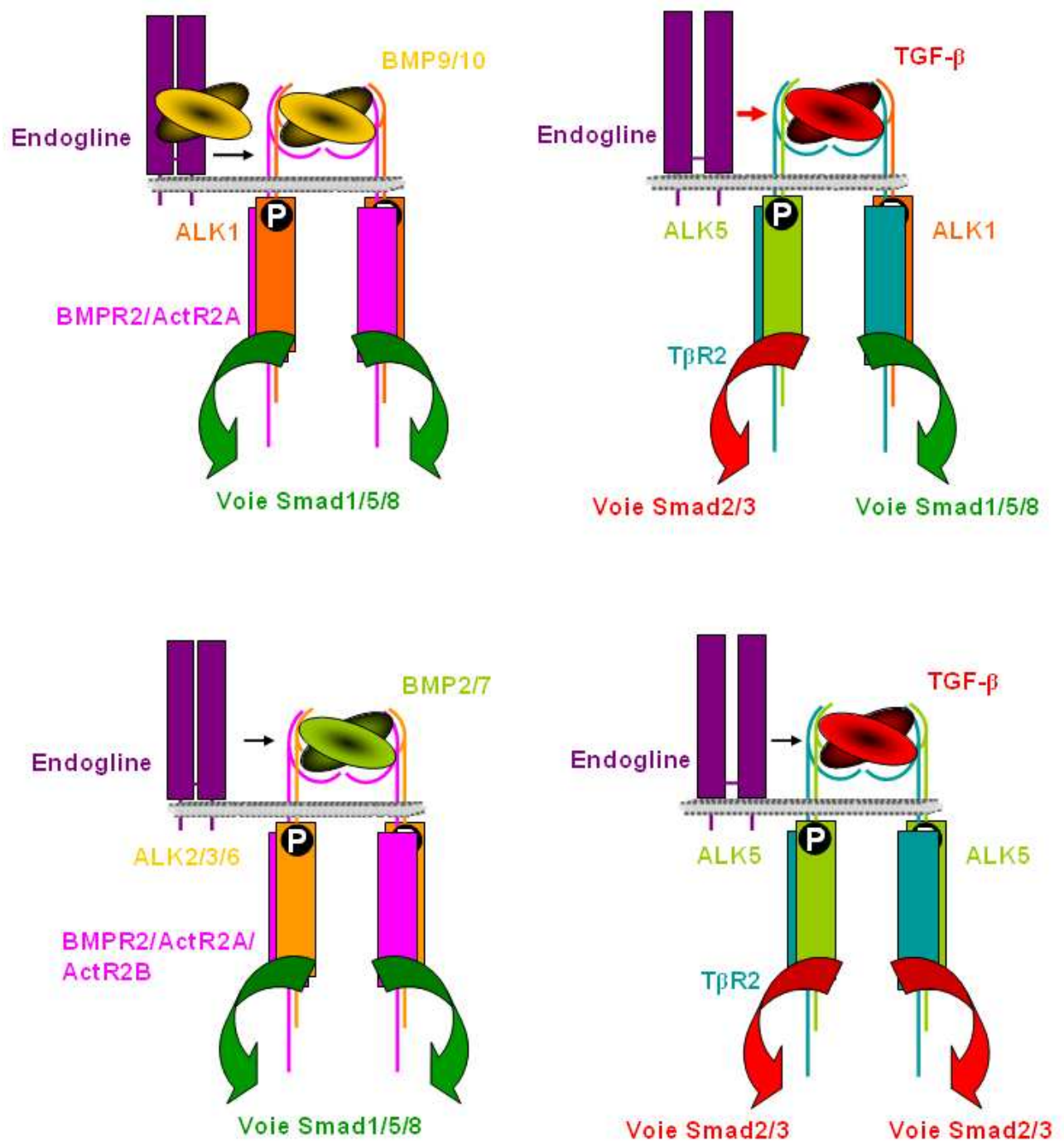


Figure 56 : Différents complexes de signalisation de l'endogline.

L'endogline peut lier les complexes de signalisation de TGF- β , BMP2, BMP7, BMP9/10 et aussi de l'activine (complexe non représenté). Ses actions activatrices ou inhibitrices sont discutées (voir texte). L'endogline est indispensable au complexe TGF- β /ALK1/ALK5 (flèche rouge). L'endogline seule ne lie pas les ligands, excepté BMP9/10.

poumon. Ainsi, dans le poumon, l'endogline est plus fortement exprimée dans les capillaires, plus faiblement dans les veines et uniquement dans les branches artérielles distales (Mahmoud M. 2009).

D'autres cellules expriment l'endogline, comme les monocytes, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules conjonctives, les kératinocytes, les fibroblastes, les syncytiotrophoblastes et les cellules de muscle lisse (Gougos A. 1988) (Lastres P. 1992) (O'Connell P. J. 1992) (Rokhlin O. W. 1995) (Adam P. J. 1998) (Chen C. Z. 2002) (St-Jacques S. 1994).

3.2.2 Complexe de signalisation de l'endogline

L'endogline est exprimée à la surface des cellules sous la forme d'un dimère covalent (présence d'au moins un pont disulfure interchaîne).

L'endogline peut lier TGF- β 1, TGF- β 2 lorsque ces ligands sont déjà liés sur T β R2 ; Activine-A et BMP7 lorsque ces ligands sont liés sur ActR2A ou B ; ainsi que BMP2 lorsqu'elle est liée à ALK3 ou ALK6 (Barbara N. P. 1999). L'endogline peut lier BMP9 sans que cette cytokine soit déjà liée par un de ces récepteurs (figure 56) (Scharpfenecker M. 2007).

Les études de l'effet de l'endogline sur la signalisation TGF- β sont contradictoires. Ainsi, plusieurs groupes ont montré un effet inhibiteur des deux isoformes de l'endogline sur la signalisation du TGF- β (Lastres P. 1996) (Letamendia A. 1998) (Li C. 2000b) (Guo B. 2004). Le groupe de Peter ten Dijke a montré que l'invalidation de l'endogline par siRNA dans des MEECs diminuait l'activation de la voie Smad1/5/8 et augmentait l'activation de la voie Smad2/3 en réponse à TGF- β ; par contre dans des MEECs dérivées d'embryons hétérozygotes pour l'endogline, les deux voies Smad sont diminuées en réponse à TGF- β (Lebrin F. 2004). Cette opposition peut s'expliquer par l'immortalisation des cellules hétérozygotes alors que les cellules sauvages étaient gardées primaires ainsi qu'une adaptation des souris, le niveau d'ALK5 étant inférieur dans les souris hétérozygotes par rapport aux souris sauvages (Lebrin F. 2004). Pece-Barbara utilisa aussi des MEECs, dérivées d'embryons sauvages et invalidées pour l'endogline puis immortalisées, et n'obtint pas les mêmes résultats puisqu'elle ne nota pas d'effet de l'endogline sur la voie Smad2/3 et nota un effet inhibiteur de l'endogline sur la voie Smad1/5/8 (Pece-Barbara N. 2005). Là aussi les lignées cellulaires

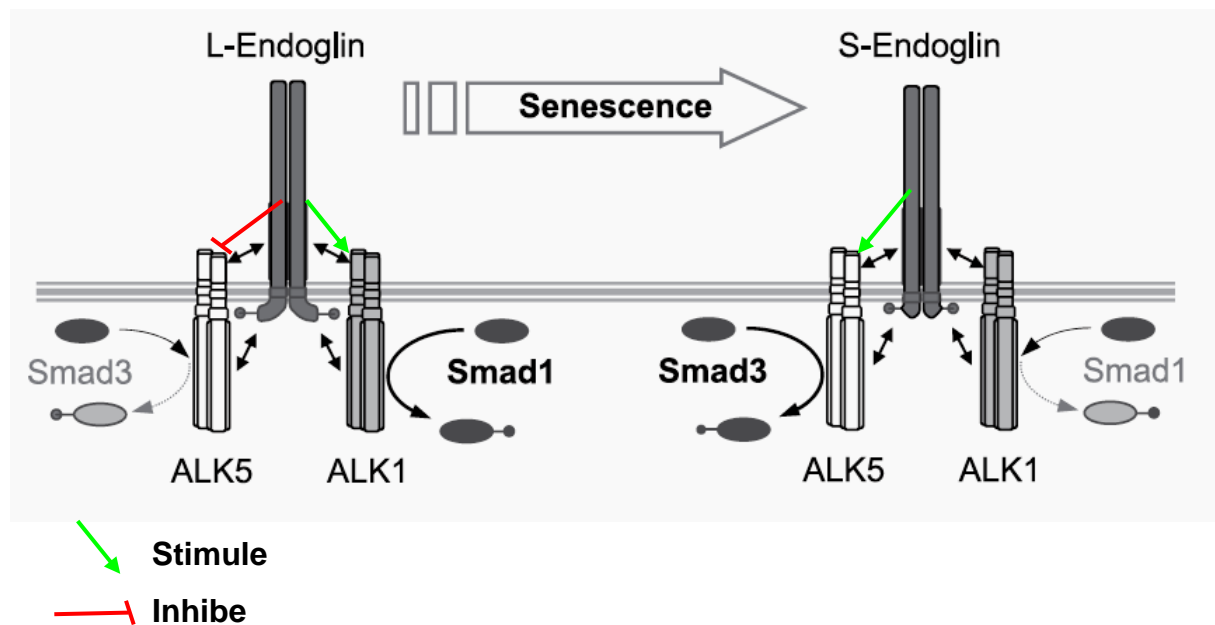


Figure 57 : Effet différentiel des deux isoformes de l'endogline sur la signalisation ALK1/ALK5.

La forme longue de l'endogline (L-Endogline) augmente la voie ALK1 et inhibe la voie ALK5, tandis que la forme courte de l'endogline (S-Endogline) augmente la voie ALK5 et ne stimule pas la voie ALK1. D'après (Lopez-Novoa J. M. 2010).

utilisées ainsi que les conditions de culture semblent influencer grandement les résultats obtenus.

Les effets peuvent aussi varier en fonction de l'état de phosphorylation de l'endogline. En effet, l'endogline peut être phosphorylée par ALK5 et T β R2, ce qui diminuerait l'interaction de l'endogline avec ces récepteurs (Guerrero-Esteo M. 2002). Une autre explication sur les résultats contradictoires réside dans le ratio entre les deux isoformes de l'endogline, S-endogline ayant une affinité plus forte pour ALK5 que pour ALK1 (Blanco F. J. 2008) et inversement pour L-endogline (Blanco F. J. 2005). Ainsi, S-endogline augmenterait la signalisation ALK5, alors que L-endogline inhiberait cette signalisation. Par contre L-endogline stimulerait la signalisation ALK1 et S-endogline n'aurait pas d'effet sur cette voie (figure 57) (Blanco F. J. 2008) (Velasco S. 2008). Le ratio entre ces deux formes variant en fonction des conditions de culture (nombre de passages, cellules primaires/immortalisées,...) (Blanco F. J. 2008), ces dernières peuvent considérablement influencer les résultats des études de l'endogline sur les voies Smad.

3.2.3 Effets cellulaires de l'endogline

Comme pour ALK1, les résultats d'étude de l'effet de l'endogline sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales sont contradictoires. Sanz-Rodriguez et collaborateurs ont surexprimé l'endogline dans une lignée de cellules endothéliales bovines (GM7372) et ont montré une inhibition de la migration des cellules endothéliales par l'endogline (Sanz-Rodriguez F. 2004). De plus, d'autres équipes ont utilisé des cellules endothéliales dérivées d'embryons de souris invalidées pour l'endogline et ont obtenu une hyper-prolifération (Pecce-Barbara N. 2005) et une augmentation de la migration (Lee N. Y. 2007). Cependant, d'autres groupes, dont celui de Peter ten Dijke, ont trouvé que les cellules endothéliales dérivées d'embryons de souris hétérozygotes ou isolées à partir de l'aorte de souris hétérozygotes avaient des défauts de prolifération et de migration (Lebrin F. 2004) (Jerkic M. 2006).

Des études ont permis de montrer qu'ALK1 phosphoryle l'endogline sur des résidus thréonine (Koleva R. I. 2006) et qu'un de ces résidus (T650) interagit avec la β -arrestine-2 (Lee N. Y. 2007). Or, un mutant T650A de l'endogline perd cette possibilité d'interaction, ce qui a pour conséquence une augmentation de la phosphorylation de Erk dans les cellules endothéliales couplée à une augmentation de leur migration. La phosphorylation sur cette thréonine par ALK1 semble donc induire une interaction entre l'endogline et la β -arrestine-2

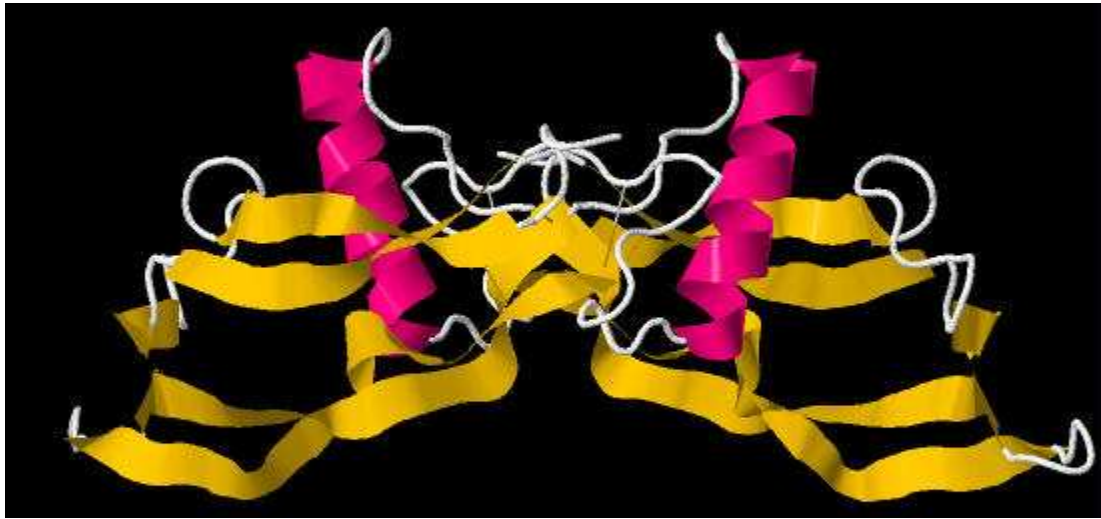


Figure 58 : Structure cristallographique du dimère mature de BMP9.
D'après (Brown M. A. 2005).

qui inhibe alors la voie Erk et par conséquent la prolifération des cellules endothéliales (Lee N. Y. 2007).

L'endogline participe aussi à l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS). En effet, l'endogline permet le recrutement d'eNOS au niveau des cavéoles et permet ainsi son interaction avec cavéoline-1 et HSP-90, protéines indispensables à la synthèse du NO par eNOS (Jerkic M. 2004) (Toporsian M. 2005). L'expression d'eNOS est activée par TGF- β via ALK5 et nécessite la présence de l'endogline (figure 64) (Santibanez J. F. 2007).

Enfin, une forme circulante par clivage du domaine extracellulaire existe. Un fort taux de cette forme est relié à un mauvais pronostic dans les cancers ou à une pré-éclampsie dans la grossesse (Li C. 2000a) (Calabro L. 2003) (Venkatesha S. 2006).

3.3 BMP9 et BMP10, ligands physiologiques d'ALK1

3.3.1 *Historique et structure de BMP9*

BMP9, appelée aussi GDF2 pour Growth and Differentiation Factor-2, a été découverte et clonée en 1994 à partir d'ADNc de foie de souris (Celeste A. J. 1994). Cette BMP est apparue comme particulière puisqu'elle avait peu d'homologie par rapport aux autres BMPs déjà connues (autour de 50 % d'homologie en acides aminés entre BMP9 et BMP2, 4, 5, 6, 7, 8). BMP9 est composée de 429 acides aminés contenant un peptide signal de 22 acides aminés, un prodomaine de 295 acides aminés et une région mature de 108 acides aminés. Après clivage par une sérine endoprotéase, la forme mature dimérique reste associée au prodomaine, sans avoir d'effet sur son activité (Chen C. 2003) (Brown M. A. 2005). La structure cristallographique de BMP9 a été réalisée en 2005 par l'équipe de Brown (figure 58) (Brown M. A. 2005). BMP9 est retrouvée dans le foie adulte, ainsi que dans le système nerveux central de la souris à partir de E 14 et dans les ostéoblastes humains (Song J. J. 1995) (Lopez-Coviella I. 2000) (Miller A. F. 2000) (Suttapreyasri S. 2006).

BMP9 peut lier directement ALK1 (David L. 2007a) (Scharpfenecker M. 2007) ainsi que l'endogline (Scharpfenecker M. 2007) (Castonguay R. 2011), et ALK2 mais uniquement en présence de BMPR2 ou ActR2 (Scharpfenecker M. 2007).

3.3.2 Effets de BMP9 sur les cellules endothéliales

Les effets de BMP9 sur les cellules endothéliales *in vitro* sont controversés. En effet, deux groupes ont publiés des effets anti-angiogéniques de BMP9 (David L. 2007a) (Scharpfenecker M. 2007). Le premier groupe a montré que BMP9 inhibe la migration des cellules endothéliales (lignée HMVECd) dans un test de blessure d'une couche confluente de cellules endothéliales et inhibe la prolifération cellulaire (David L. 2007a). Le second groupe confirma ces deux inhibitions (migration et prolifération) sur des cellules endothéliales (lignée BAEC) stimulées par du FGF2. (Scharpfenecker M. 2007). Par contre, BMP9 est décrit comme pro-angiogénique par induction de la prolifération de plusieurs lignées de cellule endothéliale, ainsi que dans la vascularisation d'un implant de Matrigel *in vivo* et dans un modèle de tumeur pancréatique (Suzuki Y. 2010). Les auteurs ont utilisés trois lignées cellulaires : les MESECs (Mouse Embryonic-Stem-cell-derived Endothelial Cells), les TECs (Tumor Endothelial Cells), ainsi que les NECs (Normal tissu Endothelial Cells). Les différences entre les lignées utilisées et leurs conditions de culture peuvent expliquer ces résultats opposés.

Une publication récente du groupe suédois de K. Pietras montre des effets complexes entre TGF- β et BMP9 sur les cellules endothéliales. En effet, les auteurs montrent un effet synergique de BMP9 et TGF- β sur des HUVECs : TGF- β et BMP9 seul ayant un effet anti-prolifératif et la combinaison des deux facteurs donnent un effet pro-prolifératif. De plus, les auteurs montrent qu'une stimulation des cellules endothéliales par TGF- β et BMP9 induit une sensibilisation des cellules aux facteurs angiogènes comme le VEGF et le FGF2 (Cunha S. I. 2010). Cependant, ces données surprenantes n'ont pas pu être confirmées dans notre laboratoire, TGF- β n'inversant pas l'effet anti-angiogénique de BMP9 décrit précédemment par notre laboratoire (données non publiées).

Enfin, BMP9 a été montrée par notre laboratoire comme circulante à des doses biologiquement actives. La dose moyenne de BMP9 dans un sérum humain est de 5 ng/mL, ce qui est bien supérieur à l'EC₅₀ (45 pg/mL) (David L. 2008). Les effets anti-angiogéniques de BMP9 décrits par le laboratoire dans des tests *in vitro* ont été confirmés par un modèle *in vivo*, BMP9 ayant inhibé l'angiogenèse induite par FGF2 dans une éponge implantée en sous-cutané chez la souris. Un rôle vasoconstricteur de BMP9 sur les vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon du poulet a été montré (David L. 2008). BMP9 est aussi

capable d'inhiber la formation d'un réseau de cellules endothéliales à partir de métatarses de fœtus murins de 17 jours stimulés avec du VEGF (Scharpfenecker M. 2007).

3.3.3 Cibles transcriptionnelles d'ALK1/BMP9

Quatre études transcriptomiques ont été réalisées à partir de cellules endothéliales en culture infectées avec un adénovirus codant pour ALK1 constitutivement actif (Ota T. 2002) (Lamouille S. 2002) (Wu X. 2006) (Lux A. 2006). Un autre groupe a utilisé des cellules endothéliales du cordon ombilical de nouveau-nés porteurs de mutations HHT-1 ou HHT-2 pour une étude transcriptomique (Thomas B. 2007). Les données de ces transcriptomes sont parfois contradictoires. Néanmoins, certains effets transcriptionnels ont pu être mis à jour. Ainsi, ALK1 induit les gènes *Id1* et *Id2*, *Endothéline1*, *Jagged1*, *Smad6*, *Smad7*, *Endogline*, *BMPR2*. Les inductions des gènes *Id1* et *2*, *Smad6* et *7*, *Endogline* et *BMPR2* ont été confirmées par la stimulation de cellules endothéliales par BMP9 et BMP10 (David L. 2007a). L'effet d'ALK1 sur l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales n'est pas clair. En effet, une étude transcriptomique le trouve induit (Wu X. 2006) tandis qu'une autre le trouve inchangé (Ota T. 2002). Une étude sur des cellules endothéliales aortiques humaines et bovines stimulées par du BMP9 montre une diminution du VEGF, alors que les tissus des souris hétérozygotes pour *ACVRL1* ont un taux de VEGF plus important que les sauvages (Shao E. S. 2009). Ces données suggèrent une inhibition du VEGF par BMP9/ALK1. L'induction de l'endothéline1 par la voie ALK1 a été confirmée lors d'une stimulation de cellules endothéliales par BMP9 (Star G. P. 2010). Enfin, soulignons que les effets transcriptionnels de BMP9 semblent être différents en fonction du récepteur de type 2 du complexe (Upton P. D. 2009). En effet, la présence de *BMPR2* permet la phosphorylation de la voie *Smad1/5/8*, l'induction de l'interleukine 8 et de la E-sélectine, et a une action antiproliférative. Par contre, la présence d'*ActR2A* permet la phosphorylation des deux voies *Smad* (même si la phosphorylation de *Smad2* est brève et faible) et n'a pas d'action antiproliférative (figure 38D).

3.3.4 Autres effets de BMP9

Plusieurs effets de BMP9 sur des cellules non endothéliales ont été décrits dans la littérature.

Le premier rôle concerne l'effet inhibiteur de BMP9 sur la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, cet effet semble indirect et passerait par la sécrétion de TGF- β induit par BMP9 (Ploemacher R. E. 1999).

BMP9 a aussi un effet chondrogenique et ostéogénique. Ainsi, l'injection d'adénovirus exprimant BMP9 ou l'injection de recombinant BMP9 chez le rat ou la souris permet de réparer des lésions osseuses. BMP9 a même un pouvoir ostéogénique supérieur à celui de BMP2, 4, 6 ou 7 (Alden T. D. 2000) (Helm G. A. 2000) (Varady P. 2001) (Li J. Z. 2003a) (Li J. Z. 2003b) (Li J. Z. 2003c) (Li J. Z. 2005) (Hills R. L. 2005) (Takahashi T. 2007). L'effet chondrogenique de BMP9 a été démontré et s'effectue via l'induction de MMP-2 (Bergeron E. 2007). BMP9 induit aussi la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) (Majumdar M. K. 2001). Cette induction passe par ALK1 et ALK2, récepteurs exprimés par les CSMs (Luo J. 2010) et est potentialisée par l'acide rétinoïque (Zhang W. 2010). BMP9 serait aussi impliquée dans l'ossification hétérotopique musculaire, en induisant l'ossification d'un muscle après une blessure (Leblanc E. 2010).

BMP9 a aussi des effets sur le système nerveux central. En effet, BMP9 est un puissant inducteur de la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones cholinergiques (Lopez-Coviella I. 2000). BMP9 induit aussi la sécrétion du NGF par une sous-population des neurones cholinergiques du cerveau antérieur basal qui expriment ALK1 (Schnitzler A. C. 2010).

Enfin, BMP9 aurait des effets sur le métabolisme du glucose et du fer. Concernant le glucose, l'injection de BMP9 réduit la glycémie de rats diabétiques par induction de l'insuline, ce qui le place en premier facteur hépatique régulant le taux de glucose sérique (Chen C. 2003) (Caperuto L. C. 2008). Dans la première étude, BMP9 induit aussi des enzymes clés du métabolisme lipidique (Chen C. 2003). BMP9 a aussi été décrite comme le responsable du taux de sécrétion basale de l'hepcidine par les cellules du foie, protéine clé dans le métabolisme du fer (Truksa J. 2006) (Babitt J. L. 2007). BMP9 est ainsi l'inducteur le plus puissant connu à ce jour de l'hepcidine (Lin L. 2007).

3.3.5 Effets de BMP9 sur les cellules tumorales

Deux études récentes ont mis en lumière un effet de BMP9 sur certaines cellules tumorales.

Un premier groupe donne un rôle pro-apoptotique de BMP9 dans le cancer de la prostate (Ye L. 2008). D'après les travaux publiés, BMP9 induirait Par-4 (Prostate Apoptosis Response-4) dans les cellules tumorales de prostate, ce qui aboutirait à l'apoptose de ces cellules. Cependant, ces travaux sont critiquables et les résultats doivent être pris avec réserve. En effet, les auteurs commencent par évoquer une diminution de l'expression de BMP9 dans les tumeurs prostatiques. Cependant, l'analyse par RT-PCR semi-quantitatives de différentes lignées cellulaires de cancer prostatique ne comporte pas en contrôle des cellules prostatiques primaires et aucun contrôle négatif n'est proposé. De plus, les marquages en immunohistochimie sur une prostate saine et sur une tumeur prostatique ne sont pas positifs de manière flagrante. Aucune analyse des surnageants des cellules en culture, qui d'après l'analyse en RT-PCR exprimeraient BMP9, n'a été effectuée. Enfin, l'induction de Par-4 par BMP9 a été montrée sur des cellules en culture avec des doses de BMP9 très élevées (20 à 40 ng/mL) ce qui montre une faible réponse des cellules prostatiques pour BMP9. D'ailleurs, ALK1 est absent de ces cellules (la présence d'ALK2, récepteur le plus proche d'ALK1, n'a pas été testée). Seul ALK6 semble présent, mais BMP9 a peu d'affinité pour ce récepteur, d'où la faible réponse de ces cellules pour BMP9.

La seconde étude a permis de révéler un rôle proprolifératif de BMP9 sur des cellules immortalisées de l'épithélium ovarien et sur des lignées de cellules cancéreuses ovariennes. Les travaux révèlent l'implication d'ALK2, et non d'ALK1, et de la voie Smad1 pour cette induction. Une analyse intéressante de biopsies de tumeurs ovariennes révèlent que 25 % des tumeurs ovariennes sécrètent du BMP9, qui devient alors un facteur autocrine, alors que l'ovaire saine ne sécrète pas de BMP9 (Herrera B. 2009).

3.3.6 *BMP10 : un ligand physiologique d'ALK1 peu connu*

BMP10 a été clonée en 1999. BMP10 fut alors trouvée principalement dans le cœur embryonnaire et adulte, et faiblement dans le foie et les poumons (Neuhaus H. 1999). Pendant le développement cardiaque, BMP10 est exprimée transitoirement dans le myocarde du trabécule ventriculaire (entre E 9 et E 13.5). Entre E 16.5 et E 18.5, BMP10 est uniquement exprimée dans les oreillettes, et son expression est restreinte à l'oreillette droite après la naissance où elle inhibe la prolifération des cardiomyocytes et la croissance cardiaque (Chen H. 2004) (Chen H. 2006). BMP10 jouerait aussi un rôle dans l'hypertrophie cardiaque consécutive à une hypertension. Cependant, dans ce cas BMP10 induirait une prolifération des cardiomyocytes (Nakano N. 2007).

BMP10 est un ligand physiologique d'ALK1 (David L. 2007a), mais elle n'a pas été décrite jusqu'à présent comme circulante.

Deux études décrivent un rôle de BMP10 dans le cancer. La première étude donne un rôle pro-apoptotique pour BMP10 sur les cellules cancéreuses prostatiques. Cette étude a été faite par le même groupe que l'étude montrant l'induction de l'apoptose des cellules prostatiques par BMP9 (Ye L. 2009). La structure très proche des deux ligands BMP9 et BMP10 permet de ne pas être surpris de cette corrélation entre les effets de BMP9 et de BMP10. Cependant, j'émet les mêmes réserves sur leurs résultats concernant BMP10 que celles que j'avais évoquées sur leur étude avec BMP9, notamment sur l'expression de BMP10 dans la prostate saine. Le même groupe a publié un effet de BMP10 sur l'agressivité du cancer du sein, où BMP10 limiterait la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Ye L. 2010). Cependant, un manque de rigueur apparaît aussi dans ces travaux. L'expression de BMP10 dans la glande mammaire saine est peu convaincante, le marquage en immunohistochimie montrant des structures fortement marquées, sans aucun contrôle de spécificité des anticorps. Le marquage détecté étant restreint à des structures particulières (non commenté), la comparaison avec les marquages dans les tumeurs s'avère complexe puisque potentiellement dépendante des zones observées. L'analyse par RT-PCR quantitative est aussi peu fiable. En effet, aucun contrôle négatif n'est disponible, le nombre de copies est faible, avec une grande variabilité dans l'analyse des tissus sains, et aucun gène rapporteur n'est utilisé ce qui ne permet pas d'exclure des différences d'efficacité de la rétrotranscription (RT). Enfin, la croissance de tumeurs surexprimant BMP10 dans les souris n'est pas

significativement différente de la croissance des tumeurs contrôles, ce qui met en doute l'effet de BMP10 sur la croissance tumorale que les auteurs veulent mettre en lumière.

4. La voie ALK1 et le cancer

Malgré les zones d'ombre nombreuses sur le rôle d'ALK1 dans l'angiogenèse, plusieurs laboratoires pharmaceutiques développent des inhibiteurs de la voie ALK1. Ainsi, Pfizer développe un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre ALK1 ; Genentech et Acceleron Pharma utilisent une protéine de fusion entre le domaine extracellulaire d'ALK1 (ALK1ecd) et la partie Fc des immunoglobulines (ALK1-Fc). Le produit de Pfizer a montré une efficacité en retardant le développement de mélanomes et de tumeurs mammaires chez la souris (Hu-Lowe D. D. 2011). Les chercheurs d'Acceleron Pharma ont montré aussi l'efficacité de leur molécule sur des modèles de cancer de pancréas et de tumeurs mammaires. Notons que leur protéine de fusion ALK1-Fc ne lie pas TGF- β , initialement décrit comme ligand d'ALK1, mais lie et inhibe BMP9 et BMP10 (Mitchell D. 2010). Les deux produits précédemment cités sont actuellement en essai clinique. Enfin, une équipe de Genentech a démontré que bloquer ALK1 altère aussi la lymphangiogenèse, ce qui pourrait augmenter l'intérêt de ces molécules dans le traitement des cancers (Niessen K. 2010).

ALK1 pourrait aussi être utilisé comme biomarqueur. En effet, le nombre de cellules endothéliales circulantes est augmenté dans le sang de patients atteints de cancer. Or, ces cellules expriment ALK1. Des tests cliniques sont en cours pour valider ALK1 comme marqueur de l'avancée d'un cancer (Mancuso P. 2009).

L'endogline soluble est aussi testée pour bloquer l'angiogenèse tumorale. L'endogline soluble est capable de lier et de neutraliser BMP9 et BMP10 dans le sérum (Castonguay R. 2011). Elle a une action anti-angiogénique sur un modèle murin de cancer du colon (Castonguay R. 2011).

5. Implication d'autres membres dans l'angiogenèse

GDF5 (également appelé BMP14) a été la première BMP décrite comme ayant un rôle sur l'angiogenèse. GDF5 augmente l'angiogenèse *in vivo* et accélère la prolifération des cellules endothéliales (Yamashita H. 1997).

BMP2 n'a pas eu d'effet dans le test de la CAM ou de la cornée de lapin (Yamashita H. 1997). Cependant, BMP2 stimule l'angiogenèse tumorale et la vascularisation d'un implant de Matrigel ou d'une éponge (Langenfeld E. M. 2004) (Raida M. 2005). Les effets de BMP2 sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales sont variables en fonction des lignées cellulaires utilisées (Langenfeld E. M. 2004) (Rothhammer T. 2007) (Raida M. 2006) (Teichert-Kuliszewska K. 2006) (de Jesus Perez V. A. 2009) (Willette R. N. 1999).

BMP4 induit l'angiogenèse dans le test de la CAM (Ramoshebi L. N. 2000) (Stabile H. 2007). Des billes relarguant du BMP4 dans l'embryon de caille augmente le nombre de vaisseaux sanguins (Nimmagadda S. 2005). BMP4 induit aussi la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Suzuki Y. 2008) (Rothhammer T. 2007) (Stabile H. 2007). Cependant, l'injection au travers de la cornée du rat induit l'apoptose de cellules endothéliales de la membrane pupillaire (Kiyono M. 2003). BMP4 induit l'apoptose des cellules endothéliales veineuses et de capillaires, tandis que les cellules artérielles sont protégées de cet effet apoptotique (Kiyono M. 2006). Cette différence est une conséquence de l'expression différentielle des Smads inhibitrices (Kiyono M. 2006).

BMP6 induit la migration de cellules endothéliales en culture ainsi que leur formation de structures tubulaires (Valdimarsdottir G. 2002) (Ren R. 2007).

BMP7 induit l'angiogenèse dans le test de la CAM et la prolifération de cellules endothéliales en culture (Ramoshebi L. N. 2000) (Stabile H. 2007) (Teichert-Kuliszewska K. 2006).

Une forme constitutivement active d'ALK2, ALK3 et ALK6 induit la prolifération de cellules endothéliales et la formation de structure tubulaire (Valdimarsdottir G. 2002).

BMP2, BMP4 et BMP7 inhibent aussi la prolifération des cellules de muscle lisse, et induisent la migration de ces cellules ainsi que leur différenciation (Nakaoka T. 1997) (Dorai H. 2000) (Morrell N. W. 2001) (Lagna G. 2006). Cependant, BMP4 n'a pas le même effet sur la prolifération des cellules de muscle lisse pulmonaire en fonction de l'origine (proximale ou périphérique) de ces cellules (Yang X. 2005).

Partie 4 : Deux maladies vasculaires de la voie TGF- β : la maladie de Rendu-Osler et l'hypertension artérielle pulmonaire

Des mutations dans la voie de signalisation de membres de la famille TGF- β ont été observées pour différentes maladies dont deux maladies vasculaires : la maladie de Rendu-Osler (également appelée HHT pour Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia) et l'hypertension artérielle pulmonaire. Je vais dans cette partie présenter les symptômes de ces maladies, les gènes impliqués, les méthodes de diagnostic, ainsi que les modèles d'étude *in vivo* et les connaissances moléculaires de ces pathologies.

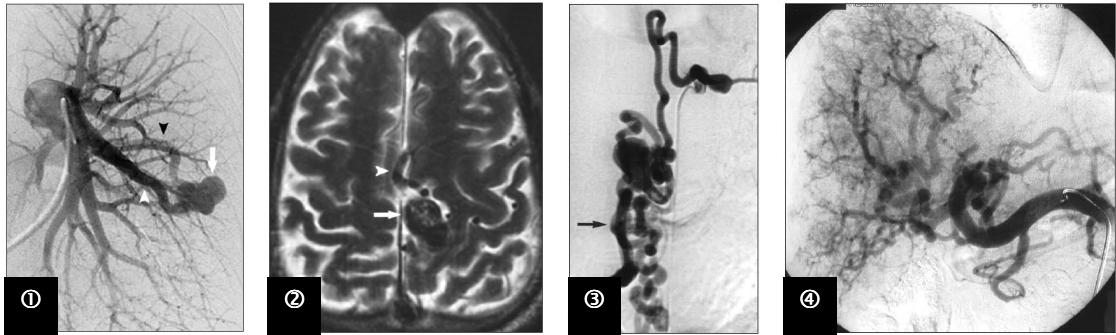
1. La maladie de Rendu-Osler

La maladie a été décrite pour la première fois par un dermatologue français, Henri Rendu, en 1896. La description a été complétée par un médecin canadien, William Osler, en 1902 et par un dermatologue anglais, Frederick Parkes Weber, en 1907. Elle a été immédiatement rebaptisée HHT pour Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, par l'américain Hanes en 1909. Cette partie exposera les connaissances actuelles sur cette pathologie.

1.1 Symptômes et diagnostic clinique

Les symptômes de la maladie n'apparaissent pas à la naissance, mais se développent avec l'âge, généralement à partir de 30/40 ans. Les critères diagnostiques ont été établis lors d'une conférence de consensus à Curaçao (Shovlin C. L. 2000). Quatre critères sont observés : 1) la survenue d'épistaxis (présents chez 95 % des patients), 2) la présence de télangiectasies (dilatations des petits vaisseaux périphériques) au niveau de la peau ou des muqueuses buccales (présentes chez 84 % des patients), 3) l'atteinte viscérale (télangiectasies pouvant être hémorragiques du tube digestif et/ou fistules artério-veineuses dans certains organes), 4) l'histoire familiale (positive chez 98 % des patients) (Plauchu H. 1989). Un patient est déclaré malade s'il est positif pour au moins trois des critères, et suspect s'il est positif pour deux critères (Dupuis-Girod S. 2010).

A



B



C

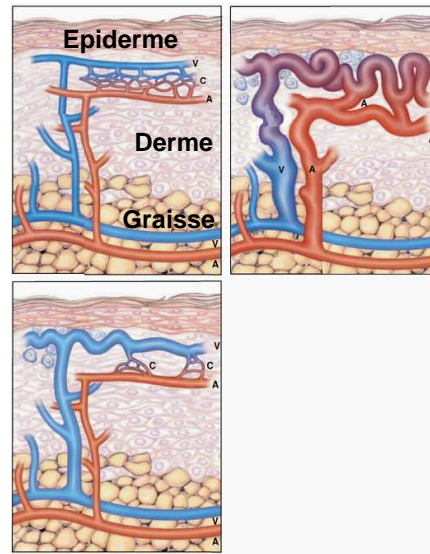


Figure 59 : Symptômes de la maladie de Rendu-Osler.

A : Imageries des fistules artério-veineuses. ① Fistule pulmonaire par angiogramme. Pointe blanche : artère, flèche : fistule, pointe noire : veine. ② Fistule cérébrale (flèche) avec dilatation d'une veine (pointe) par IRM. ③ Fistules artério-veineuses de la moelle épinière par angiogramme. ④ Artère hépatique dilatée et tortueuse par angiogramme. D'après (Jaskolka J. 2004).

B : Télangiectasies cutanée sur un patient. D'après (Srinivasan S. 2003).

C : Représentation schématique d'une évolution d'une télangiectasie cutanée. A : Artère, V : Veine, C : Capillaires. La première étape est la dilatation des veines. La disparition progressive des capillaires se produit alors. Au final les artères sont dilatées et directement connectées aux veines dilatées. D'après (Guttmacher A. E. 1995).

Les épistaxis sont spontanées, irrégulières, récidivantes. Elles entraînent souvent une anémie et une asthénie et sont socialement gênantes. L'anémie résultante de ces saignements oblige le patient à une reconstitution continue des réserves de fer (parfois via des transfusions). Elles sont dues à des télangiectasies disséminées dans la tache rouge nasale. Les télangiectasies cutanées et muqueuses, souvent localisées au niveau du visage, des doigts et des muqueuses buccales (lèvres, langue), atteignent ensuite l'estomac et accessoirement l'intestin. Une télangiectasie peut aussi évoluer en grossissant à cheval sur la jonction capillaire qu'elle élargit, créant ainsi un shunt artério-veineux : c'est la fistule artério-veineuse (figure 59). Elles se manifestent principalement dans l'intestin, le foie, les poumons ou le système nerveux central. Les manifestations cliniques sont trompeuses et dépendent du nombre, de la taille et de la localisation de ces fistules (Bailly S. 2010).

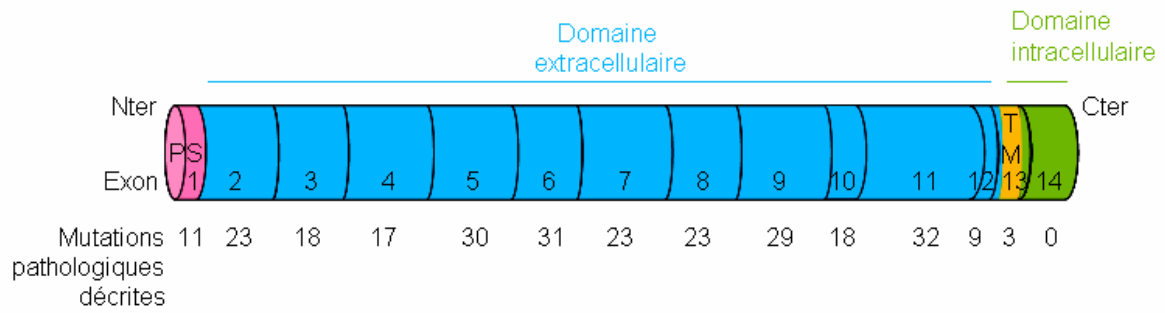
1.2 Génétique de la maladie de Rendu-Osler

Trois gènes sont responsables de cette pathologie. La grande majorité des cas (> 80 %) est causée par des mutations du gène *ENG*, codant pour l'endogline et responsable de HHT-1 (McAllister K. A. 1994), ou du gène *ACVRL1*, codant pour ALK1 et responsable de HHT-2 (Johnson D. W. 1996). Des mutations de *MADH4*, codant pour Smad4, sont retrouvées sur des patients atteints d'une combinaison du syndrome de la polyposie juvénile (causé aussi par des mutations d'ALK3) et HHT (Gallione C. J. 2006). Ces gènes appartiennent donc à la voie de signalisation de la famille TGF- β présentée précédemment. Il existe au moins deux gènes non identifiés responsables de "formes pures" de la maladie. HHT3 est causé par un gène porté par le chromosome 5q (Cole S. G. 2005) (Govani F. S. 2010) et HHT4 par un gène du chromosome 7p (Bayrak-Toydemir P. 2006).

Plusieurs études montrent que les enfants dont les deux parents sont affectés avec un même gène muté (mais dont la mutation n'est pas forcément identique) sont soumis à une létalité in utéro ou infantile lorsqu'ils reçoivent deux allèles mutés (Snyder L. 1944) (Karabegovic A. 2004) (El-Harith el H. A. 2006) (Wooderchak W. 2010).

Une des caractéristiques de cette pathologie est la grande variabilité des symptômes et de leur gravité à l'intérieur même d'une famille, suggérant que d'autres facteurs génétiques inconnus ou que des facteurs environnementaux influencent le phénotype HHT. Les corrélations phénotype-génotype entre les types cliniques HHT-1 et HHT-2 ne portent que sur le pourcentage respectif des diverses complications qui peuvent toutes être présentes avec

A



B

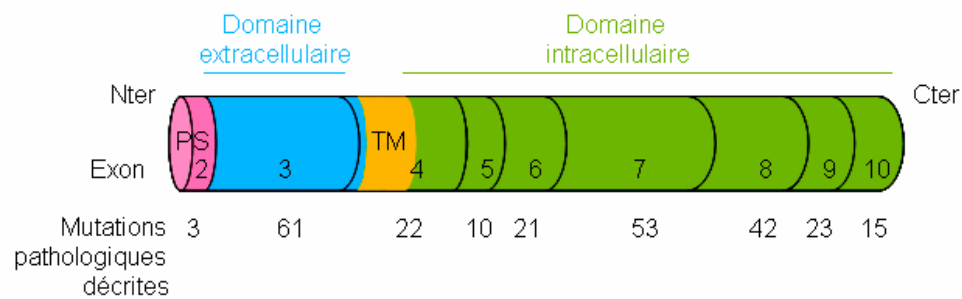


Figure 60 : Répartition des mutations HHT sur les gènes codant pour l'endogline (A) et ALK1 (B).

Seules les mutations pathologiques localisées dans les exons et répertoriées dans la base de données internationale des mutations HHT (www.hhtmutilation.org) sont représentées.

chaque gène. Plusieurs études existent sur ce sujet. Je ne citerai ici que l'étude la plus vaste, menée sur 93 patients HHT-1 et 250 patients HHT-2, issus du réseau franco-italien de Rendu-Osler. Cette étude montre une prévalence des fistules pulmonaires chez les patients HHT-1 (34,4 % des patients HHT-1 ont des fistules symptomatiques, contre 5,2 % pour les HHT-2 ; et 54 % des patients HHT-1 ont des fistules pulmonaires non symptomatiques, contre 12,8 % pour les HHT-2), tout comme pour les fistules du système nerveux central (7,5 % des patients HHT-1 atteints, contre 0,8 % des HHT-2). Par contre, les hémorragies gastrointestinales sont plus fréquentes pour les patients HHT-2 (16,4 %) que pour les HHT-1 (6,5 %) et seuls des patients HHT-2 développent des fistules hépatiques (Lesca G. 2007). Notons aussi que les femmes ont des symptômes plus graves que les hommes, en ce qui concerne les fistules pulmonaires et hépatiques (Lesca G. 2006) (Letteboer T. G. 2006) (Garcia-Tsao G. 2007). Les manifestations hépatiques qui nécessitent une transplantation de foie sont d'ailleurs retrouvées presque exclusivement sur des patientes (Garcia-Tsao G. 2007). Ainsi, sur les quinze dernières transplantations hépatiques réalisées au CHU de Lyon sur des patients HHT, quatorze ont été réalisées sur des femmes (communications personnelles avec les médecins du service de génétique). Enfin, la pénétrance de cette maladie augmente avec l'âge pour atteindre 97 % à 60 ans (Plauchu H. 1989).

Plus de 600 mutations d'*ACVRL1* ou d'*ENG* ont été décrites (cf. la base de données des mutations HHT : <http://www.HHTmut.org>) (figure 60). Tous les types de mutation sont retrouvés : délétions, insertions, faux-sens, non-sens et mutations d'un site d'épissage (Govani F. S. 2009).

Quatre études ont montré en 2011 des cas de mosaïsme sur ces patients atteints de la maladie (McDonald J. 2011) (Lee N. P. 2011) (Best D. H. 2011) (Eyries M. 2011). Le mosaïsme se définit par la présence de deux populations cellulaires aux génotypes différents dans un individu qui s'est développé à partir d'un œuf fertilisé (Austin K. D. 1992). Le mosaïsme résulte de la mutation d'une cellule mitotiquement active dans le fœtus qui engendre une population de cellules filles porteuses de la mutation, tandis que les cellules filles issues des autres cellules mitotiquement actives ne sont pas porteuses de la mutation. Les patients sont donc hétérozygotes (WT/Mut) dans certaines cellules et homozygotes (WT/WT) dans d'autres. Des cas de mosaïsme ont été rapportés pour des patients sans histoire familiale avec HHT. Suivant le taux de cellules porteuses de la mutation dans le patient, la détection du mosaïsme est plus ou moins difficile et peut nécessiter le prélèvement de cellules de différents tissus (sang, cavité buccale, follicules pileux). Suivant le stade embryonnaire où la mutation s'est produite et les types de cellules atteintes, les cellules germinales peuvent être atteintes ce

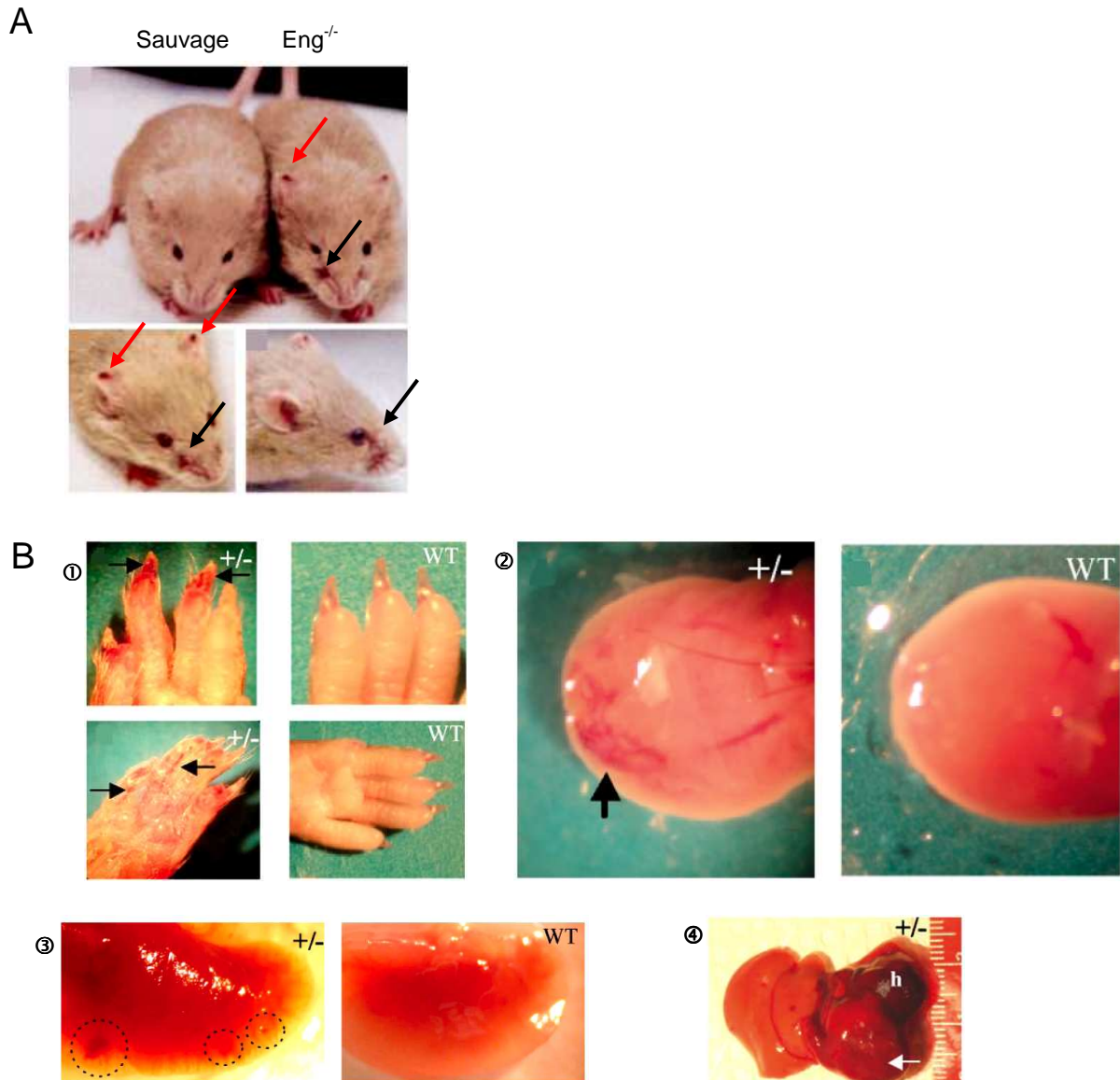


Figure 61 : Modèles animaux pour HHT.

A : Les souris hétérozygotes pour l'endogline dans le fond génétique 129/Ola présentent des télangiectasies au niveau des oreilles (flèches rouges) et des saignements de la muqueuse nasale (flèche noire). D'après (Bourdeau A. 1999).

B : Les souris hétérozygotes pour ALK1 présentent ① des lésions vasculaires sous les griffes (flèches), ② des télangiectasies sur la langue (flèche), ③ des lésions vasculaires dans les poumons (cercles), ④ des nodules et des hémorragies (h) hépatiques dans certains lobes (flèche). D'après (Srinivasan S. 2003).

qui entraîne une possible transmission dans la descendance du patient. Des mutations d'*ACVRL1* et d'*ENG* ont été rapportées chez ces patients. Un cas plus rare provient d'une patiente sans histoire familiale avec HHT et porteuse de deux mutations d'*ACVRL1* : c.1388del et c.1390del (Eyries M. 2011). Il s'agit là d'une mutation du même allèle en deux mutations différentes suite à une altération génétique mère qui n'est plus détectable. Cette patiente présente des cellules hétérozygotes avec un allèle sauvage et un allèle porteur d'une des deux mutations décrites. Les cellules germinales et somatiques de la patiente sont hétérozygotes.

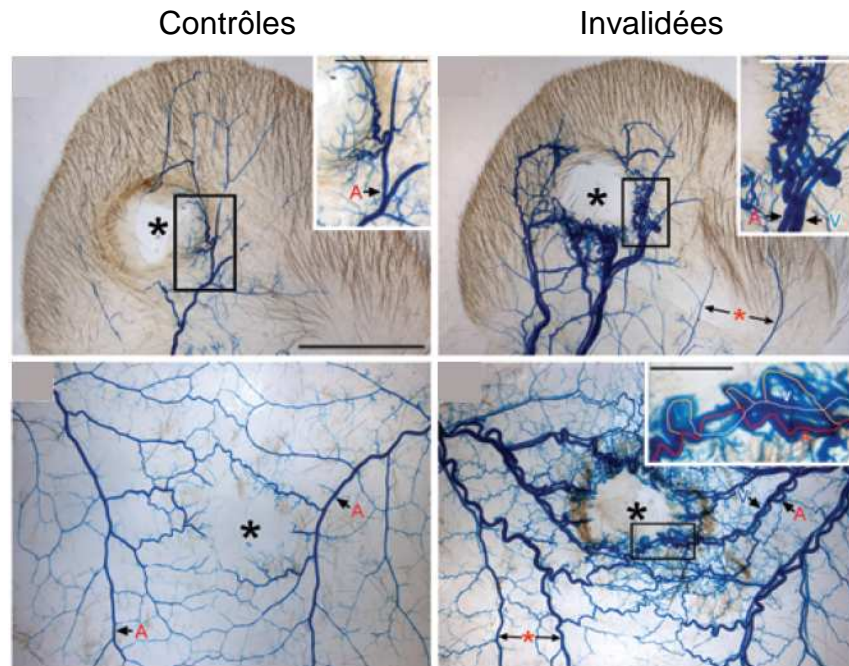
1.3 Modèles animaux d'étude de la maladie de Rendu-Osler

Les implications de l'endogline et d'ALK1 dans la maladie de Rendu-Osler ont été confirmées par leur invalidation hétérozygote dans des modèles murins. Les invalidations totales d'ALK1 et de l'endogline sont létales (cf. Partie 3, 2.2). Les invalidations hétérozygotes de ces gènes sont par contre viables.

La première description d'une invalidation hétérozygote a été faite pour l'endogline en 1999. Les souris *Eng* +/- se développent normalement mais certaines montrent des signes cliniques relatifs à HHT, comme des saignements de nez ou des télangiectasies (figure 61A). Le fond génétique de la souris semble très important pour la visualisation des symptômes. Ainsi, dans un fond pur 129/Ola, 50 % des souris *Eng* +/- montrent des télangiectasies à 7 mois et 30 % montrent des saignements de nez. Dans le fond génétique non pur C57BL/6 - 129/Ola, 4 souris sur les 227 observées montrent des saignements de nez et 14/227 montrent des télangiectasies. Enfin, dans un fond CD1 – C57BL/6 – 129/Ola, aucune souris ne présente de symptôme. Le fond génétique 129/Ola semble donc plus sensible que les autres au niveau d'endogline, ce qui permet de penser que des facteurs génétiques influencent la gravité de la maladie chez les patients. Cependant, l'hétérogénéité des symptômes au sein des souris 129/Ola montre que des facteurs non génétiques influencent aussi le phénotype (Bourdeau A. 1999).

La description de l'invalidation hétérozygote d'ALK1 a été faite en 2003 (Srinivasan S. 2003). Sur les 47 souris étudiées (dans le fond génétique prédominant C57BL/6), 23 % ont montré des lésions vasculaires au niveau cutané et des extrémités, 6 % au niveau des muqueuses orales et 28 % sur des organes internes (figure 61B). Les lésions observées sont des vaisseaux dilatés à la paroi fine et des hémorragies, notamment intestinales. Ce phénotype

A



B

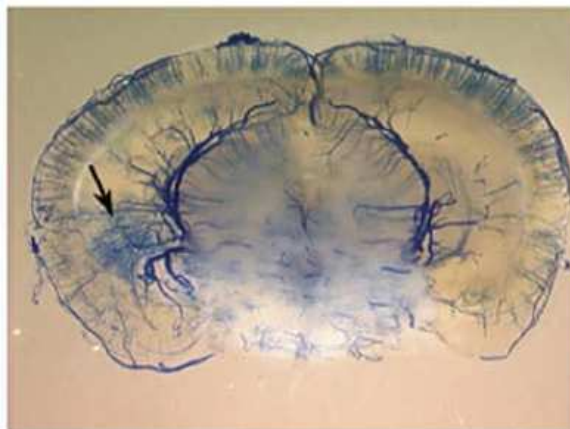


Figure 62 : Formation de fistules artério-veineuses dans des souris invalidées pour ALK1.

A : L'invalidation d'ALK1 dans les cellules endothéliales est induite dans des souris adultes (> 2 mois) et une blessure est réalisée dans le derme. Des billes de latex bleu permettent 8 jours après de visualiser les vaisseaux formés pendant la cicatrisation. Les souris contrôles génèrent un arbre vasculaire classique pour la cicatrisation, tandis que les souris invalidées présentent des fistules artério-veineuses importantes. D'après (Park S. O. 2009).

B : Formation de fistules artério-veineuses (flèches noires) dans les zones invalidées pour ALK1 et stimulées avec VEGF-A dans le cerveau. Visualisation par injection de billes de latex. D'après (Walker E. J. 2010).

est comparable aux symptômes de la maladie de Rendu-Osler. Notons aussi que le phénotype apparaît sur des souris âgées (1 an minimum), ce qui corrèle bien avec l'apparition tardive des symptômes de la maladie. Afin de mieux comprendre le développement de ces lésions vasculaires tardives, le groupe de P. Oh a réalisé des souris dont l'inactivation d'ALK1 est inducible (la recombinaison Cre étant sous le contrôle d'un promoteur inducible par le tamoxifène) (Park S. O. 2009). L'inactivation d'ALK1 dans des souris adultes (âgées de plus de 2 mois) est létale en 9 à 21 jours. Les souris montrent dès 8 jours des signes cliniques de souffrance avec une perte de poids, une anémie, une oxygénation du sang en baisse, des hémorragies intestinales et pulmonaires. Les veines et artères pulmonaires sont dilatées. Quelques fistules artério-veineuses sont visibles dans le tractus digestif et l'utérus. Les femelles meurent d'ailleurs plus tôt (9 à 14 jours après l'inactivation d'ALK1) que les mâles (10 à 21 jours après l'inactivation). Les auteurs ont aussi réalisé une blessure cutanée sur ces souris après inactivation d'ALK1. Des jonctions directes entre les artères et les veines sont alors visibles dans la zone proche de la blessure, avec une dilatation des vaisseaux qui deviennent tortueux ([figure 62A](#)). Cette expérience montre l'importance d'un facteur environnemental (la blessure) pour la formation des fistules artério-veineuses.

L'effet des facteurs environnementaux qui sont susceptibles d'induire des facteurs angiogènes (comme le VEGF) sur la formation des jonctions artério-veineuses a été étudié par deux études similaires effectuées par la même équipe. La première étude utilise les souris hétérozygotes *ACVRL1* +/- (Hao Q. 2008). Les auteurs injectent dans l'hémisphère gauche du cerveau un adénovirus exprimant une forme du VEGF. Deux semaines après, une pompe est installée dans l'hémisphère droit et délivre en permanence des substances vasodilatrices (hydralazine ou nicardipine) qui augmentent le flux sanguin cérébral. Deux semaines après l'installation des pompes, les souris sont euthanasiées. Les auteurs montrent que l'augmentation du flux sanguin ainsi que l'expression du VEGF participe à la formation de dysplasies sur les capillaires. Dans la seconde étude, les auteurs utilisent des souris ALK1 "floxed" et injectent un adénovirus exprimant la Cre recombinaison dans le cerveau (Walker E. J. 2010). Un adénovirus exprimant le VEGF est injecté simultanément. Les souris sont sacrifiées huit semaines après l'injection. Les auteurs montrent alors que le VEGF induit dans les souris invalidées localement pour ALK1 des fistules artério-veineuses importantes ([figure 62B](#)), alors que les souris ayant reçu la GFP (Green Fluorescent Protein) à la place de la Cre recombinaison ne présentent pas de fistules en réponse au VEGF. La délétion d'ALK1 seule ne donne pas non plus de fistules artério-veineuses. Notons enfin que cette équipe a injecté l'adénovirus exprimant le VEGF dans des souris hétérozygotes pour l'endogline

(Hao Q. 2010). Ils ont alors obtenu une dysplasie vasculaire plus forte qu'avec les souris *ACVRL1* +/-, ce qui se corrèle bien aux symptômes cérébraux des patients HHT, plus importants pour les patients HHT-1 que pour les patients HHT-2.

L'ensemble des modèles animaux pour HHT-1 et HHT-2 suggère fortement le rôle d'un "second hit" dans la formation des lésions vasculaires consécutives à l'inactivation au moins partielle d'ALK1 ou de l'endogline. En ce sens, des facteurs environnementaux induisant l'angiogenèse ou des facteurs génétiques seraient à l'origine de l'induction de ces lésions.

1.4 Etudes fonctionnelles de mutations impliquées dans la maladie de Rendu-Osler

1.4.1 Etudes des mutations de *ENG* pour HHT-1

Il existe à ce jour 329 mutations pathologiques recensées dans la base de données HHT (www.HHTmutation.org). Ces mutations sont réparties en deux types : 1) les mutations faux-sens (mutation d'un seul nucléotide se traduisant par la substitution d'un seul acide aminé), 2) les mutations qui aboutissent à une protéine tronquée (mutation non-sens où un seul nucléotide muté donne un codon stop, insertion ou délétion aboutissant à un décalage du cadre de lecture (appelé frameshift) qui aboutit à un changement de plusieurs acides aminés et à un codon stop prématuré, mutation d'un site d'épissage entraînant l'exclusion d'un ou plusieurs exon(s), large délétion ou duplication aboutissant à une protéine totalement aberrante). Concernant les mutations du gène *ENG*, 20 % sont des mutations faux-sens et 80 % sont des mutations entraînant une protéine tronquée (13 % de mutations non-sens, 42 % de "frameshift", 16 % de mutations de site d'épissage, 9 % de délétions ou duplications larges). Dans l'analyse des mutations sur les patients français, l'étude menée par G. Lesca n'a détecté que des mutations donnant une protéine tronquée (Lesca G. 2006). La prévalence des mutations se traduisant par une protéine tronquée a été confirmée dans l'ensemble des études des mutations causant HHT-1.

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer un modèle moléculaire pour HHT-1. La première proposition a été faite un an après la découverte de la responsabilité du gène *ENG* dans HHT-1. Le groupe de D. Marchuk publia six mutations aboutissant toutes à

une protéine tronquée et proposa que la protéine tronquée exerce un effet dominant-négatif sur la protéine normale, aboutissant ainsi à une perte totale ou quasi-totale de l'endogline membranaire (McAllister K. A. 1995). Cependant, l'accès à des cellules de patients HHT-1 contredit ce modèle dès 1997 (Pece N. 1997). Le groupe de Michelle Letarte purifia des cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical (HUVECs) provenant de nouveau-nés porteurs d'une mutation d'*ENG* et des monocytes de patients HHT-1. Les monocytes expriment l'endogline après leur différenciation en macrophage *in vitro* (Lastres P. 1992). Ce groupe étudia trois mutations aboutissant à une protéine tronquée. Les auteurs démontrèrent alors que les niveaux d'endogline dans les HUVECs ou les monocytes activés de patients HHT-1 étaient 50 % plus faibles que dans les cellules de personnes saines. Une surexpression de ces mutants dans des Cos-1 a permis de montrer une expression transitoire de la protéine tronquée et une incapacité de ces mutants à s'exprimer au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, le modèle d'haploinsuffisance avec un effet non dominant-négatif des mutants a été proposé. Ce groupe confirma leur modèle en étudiant par les mêmes modèles quatre mutations faux-sens qui ne donnaient pas de protéine membranaire (Pece-Barbara N. 1999). Depuis, le groupe de Michelle Letarte et plusieurs autres ont multiplié les études fonctionnelles des mutations d'*ENG*, confirmant à chaque fois l'haploinsuffisance comme modèle de HHT-1 (Shovlin C. L. 1997) (Gallione C. J. 1998) (Cymerman U. 2000) (Abdalla S. A. 2000) (Paquet M. E. 2001).

Il est de nos jours admis que les mutations responsables de HHT-1 donnent, soit des protéines tronquées, soit des protéines dont la substitution d'un acide aminé aboutit à un changement de conformation important, ce qui a pour conséquence une dégradation de la protéine anormale et une expression de l'allèle sauvage uniquement, d'où la réduction de 50 % du taux d'endogline membranaire chez les patients. Notons que le taux d'endogline sur les monocytes de patients HHT-1 varie en fonction de l'âge des patients (Fernandez L. A. 2006). Il est réduit de 50 % par rapport au taux attendu sur les sujets jeunes (< 40 ans) et diminue ensuite. Cette diminution peut expliquer l'âge tardif d'apparition des symptômes. L'absence de sujets contrôles pour chaque âge dans cette étude ne nous permet pas de savoir si les patients ont toujours 50 % d'endogline en moins par rapport aux sujets non atteints.

1.4.2 Etudes des mutations d'*ACVRL1* pour HHT-2

La base de données des mutations d'*ACVRL1* recense actuellement 272 mutations. En comparaison avec les mutations d'*ENG*, les mutations d'*ACVRL1* sont plus fréquemment des mutations faux-sens (48 %). Les autres types de mutations sont des non-sens (11 %), des frameshift (31 %), des mutations des sites d'épissage (7 %), ainsi que des délétions larges ou des duplications (3 %). L'étude de la population française a confirmé ces données avec 61 % de mutations faux-sens (Lesca G. 2006). Dès lors, l'étude de mutations faux-sens est apparue plus utile que pour l'endogline.

La première étude des mutations d'*ACVRL1* a été menée en 1999 par le groupe de D. Marchuk (Lux A. 1999). Dans cette étude, quatre mutations (trois faux-sens et une non-sens) du domaine extracellulaire sont étudiées. La voie de signalisation d'ALK1 et son ligand étant non connus en 1999, l'équipe a réalisé des récepteurs chimériques dont le domaine intracellulaire est celui d'ALK5, signalisant par la voie Smad2/3. L'équipe ayant découvert l'existence d'un ligand dans le sérum, la stimulation de ce récepteur chimérique est réalisée avec 20 % de sérum humain. Les auteurs montrent alors une perte totale de la signalisation pour les récepteurs mutés. C'est en 2003 qu'une analyse plus vaste de mutations d'*ACVRL1* est proposée par le groupe de Trembath (Harrison R. E. 2003). Les auteurs ont étudié quinze mutations, deux délétions et treize faux-sens. Les auteurs étudient principalement la localisation cellulaire des mutants avec une étiquette GFP ou Myc et une observation en immunofluorescence. L'utilisation d'une étiquette GFP peut changer la localisation cellulaire de la protéine à cause de sa taille importante et rend la méthode choisie peu judicieuse. Néanmoins, les auteurs ont trouvé la quasi-totalité des mutants intracellulaires. Pour les trois mutants trouvés à la membrane, aucune étude de leur signalisation n'a été effectuée. Un groupe chinois a publié une autre étude en 2006, étudiant neuf mutations faux-sens d'*ACVRL1* (Gu Y. 2006). Les auteurs étudient le niveau basal d'activation de la voie Smad1/5/8, c'est-à-dire en l'absence de ligand, par la surexpression d'ALK1 (sauvage ou mutée). Il trouve alors que les mutants sont dépourvus d'activité de signalisation, sauf R411Q qui aurait une activité réduite mais présente. Il trouve un effet dominant-négatif de ces mutants sur la signalisation d'ALK1 sauvage en taux basal. Mais le choix des auteurs de ne pas utiliser de ligand (publié comme étant TGF- β 1 à l'époque) est critiquable, l'activité basale étant faible. La même année le groupe espagnol de Luisa Botella a publié une étude de trois mutations d'ALK1 (trois mutations faux-sens dans le domaine kinase) (Fernandez L. A. 2006). Les auteurs utilisent ici

TGF- β 1 pour étudier l'activité des mutants sur la voie Smad1/5. Après avoir montré un taux d'expression normal dans les cellules de patients, les auteurs démontrent une absence d'activité des récepteurs en réponse à TGF- β 1 et trouvent même un effet dominant-négatif plus ou moins marqué en fonction des mutants. Ils concluent ainsi que le modèle d'haploinsuffisance ne s'applique pas forcément aux mutants d'*ACVRL1*. Avant mes travaux de thèse, aucune étude des mutations d'*ACVRL1* liées à HHT-2 n'a donné un modèle moléculaire clair à cette maladie. Aucune étude n'a testé la réponse de ces mutants à BMP9, ligand d'ALK1 décrit en 2007 (David L. 2007a).

Une analyse de mutations du gène de la drosophile *sax*, gène orthologue d'*ACVRL1* et d'*ACVRI* (gène codant pour ALK2), a été réalisée (Twombly V. 2009). Cette étude montre deux types de mutations : des mutations avec gain de fonction et des mutations avec perte de fonction. Il est intéressant de noter que les mutations qui se révèlent être des gains de fonction sont proches des mutations trouvées chez l'homme pour *ACVRI* et responsables de fibrodysplasie ossifiante progressive, mutations avec gain de fonction chez l'homme. Les mutations qui se rapprochent de celles trouvées sur *ACVRL1* et responsables de HHT-2 sont démontrées comme perte de fonction chez la drosophile, comme chez l'homme. L'effet dominant-négatif, décrit par certaines études fonctionnelles de mutations chez l'homme, est retrouvé ici pour une mutation. Les auteurs se basent sur l'effet non réparateur de la surexpression de *dpp*, équivalent de BMP2/4 chez l'homme, dans l'embryon contenant cette mutation. Cependant, aucune étude n'a démontré que *dpp* était le ligand de *sax*.

1.5 Modèles moléculaires et cellulaires de HHT

Il n'existe pas de modèle bien déterminé pour la maladie. Cinq modèles coexistent : 1) une angiogenèse excessive, 2) une apoptose accrue des cellules endothéliales, 3) un découplage de la réaction de synthèse du NO, 4) une réaction inflammatoire excessive, 5) une perte dans la différenciation artère/veine. Les différences de phénotypes, notamment concernant les sites altérés entre les deux principaux types de HHT (HHT-1/HHT-2) permettent de penser que ces deux maladies sont en fait distinctes. Ainsi certains modèles ne sont valables que pour un seul type de HHT.

Le premier modèle consiste à expliquer les fistules artério-veineuses par une angiogenèse excessive. Les données les plus récentes sur HHT suggèrent que les mutations d'*ACVRL1* ou de l'*Endogline* seraient délétères pendant certaines phases de l'angiogenèse,

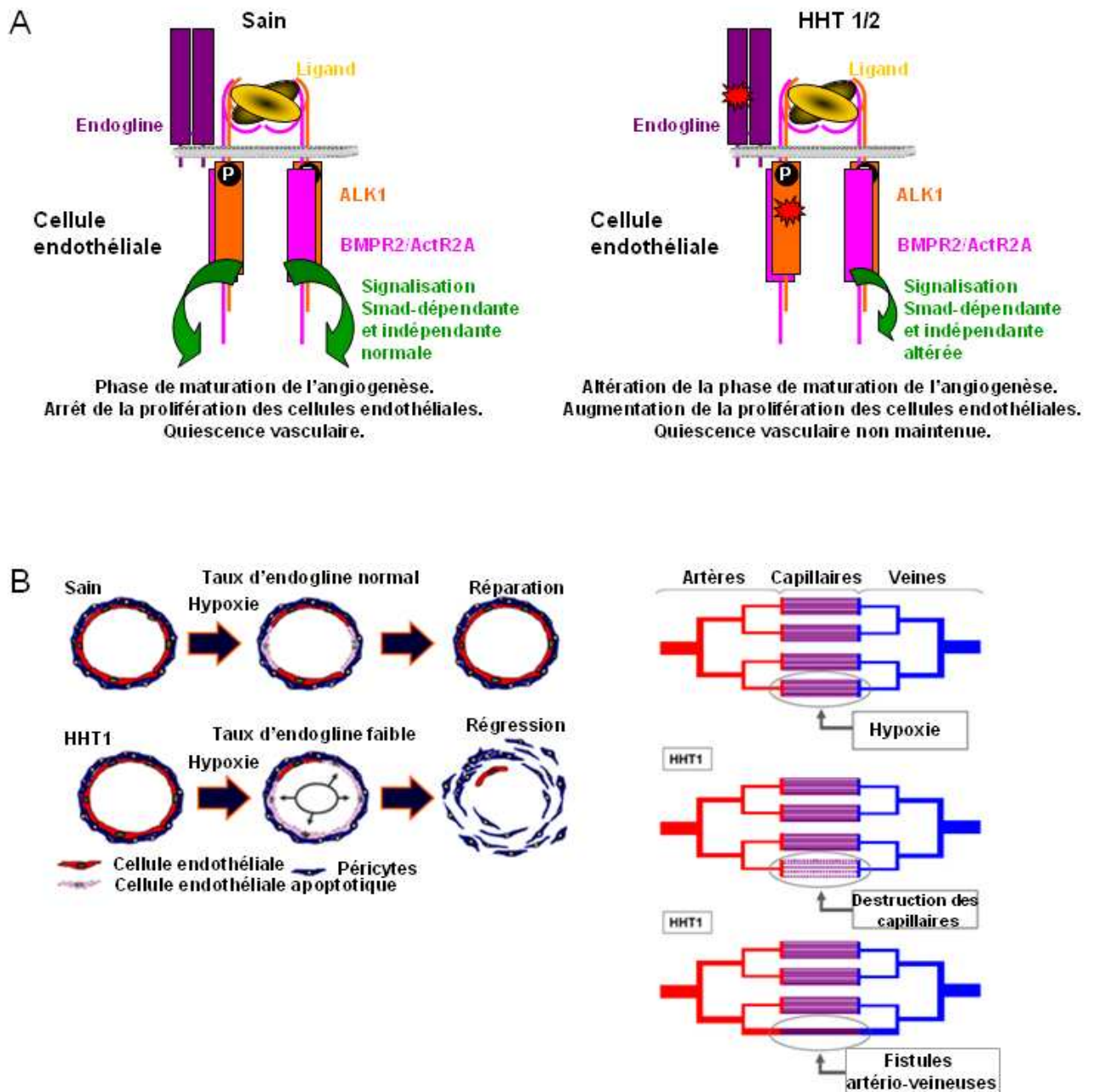


Figure 63 : Modèles moléculaires et cellulaires de HHT.

A : Modèle pour HHT1 et HHT2 d'une angiogenèse excessive. La voie ALK1 est impliquée dans la phase de maturation de l'angiogenèse et la quiescence vasculaire en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les mutations d'ALK1 ou de l'endogline altèrent cette signalisation et conduit à une perturbation de la phase de maturation et de quiescence vasculaire.

B : Modèle pour HHT1 impliquant l'apoptose des cellules endothéliales déficientes en endogline et soumises à un stress hypoxique. Cette apoptose détruit les capillaires, et aboutit à des fistules artério-veineuses. D'après (Lopez-Novoa J. M. 2010).

avec spécifiquement un effet sur la stabilité des nouveaux vaisseaux formés. Les concepts clé du développement des fistules artério-veineuses sont les suivants : 1) Le développement des fistules a lieu après une activation des cellules endothéliales par une blessure ou par l'angiogenèse physiologique (Park S. O. 2009) (Mahmoud M. 2010) (Lebrin F. 2010). 2) A la suite d'un stimulus angiogénique, les cellules endothéliales prolifèrent excessivement (Mahmoud M. 2010) (Lebrin F. 2004) (Pece-Barbara N. 2005), avec un bourgeonnement excessif qui conduit aux fistules (Mahmoud M. 2010) (Lebrin F. 2010) (Lebrin F. 2004) (Park S. O. 2009). Cette phase d'activation de l'angiogenèse excessive peut être expliquée par un taux de VEGF dans le plasma plus important chez les patients HHT (Cirulli A. 2003), qui peut s'expliquer par la perte de la répression de l'expression du VEGF par la voie ALK1 (Shao E. S. 2009). De plus, la diminution de la voie ALK1, responsable de la diminution de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (David L. 2007a) (Scharpfenecker M. 2007), favorise cette angiogenèse excessive. 3) Le recouvrement des vaisseaux est défaillant (Oh S. P. 2000) (Mancini M. L. 2009), en partie via une réduction de la production de TGF- β par les cellules endothéliales (Carvalho R. L. 2004) (Letarte M. 2005), ce qui entraîne une baisse de la différenciation des cellules précurseurs des cellules murales en cellules de muscle lisse. Ce recouvrement défaillant aboutit à des vaisseaux fragiles, susceptible de se rompre, d'où les hémorragies et les saignements de nez importants (figure 63A).

Un second modèle propose une apoptose accrue dans les cellules endothéliales soumises à une hypoxie chez les patients HHT-1. En effet, l'endogline protège les cellules endothéliales de l'apoptose consécutive à une hypoxie prolongée (Li C. 2003b). Les cellules endothéliales des capillaires soumises à une hypoxie rentreraient alors en apoptose chez les patients HHT-1, ce qui entraînerait la disparition des capillaires aboutissant aux jonctions directes entre les veines et les artères (figure 63B).

Un autre modèle pour HHT-1 propose que les fistules artério-veineuses soient consécutives à un défaut dans l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS). L'eNOS convertie la L-Arginine en L-citrulline et NO. Cette réaction nécessite une interaction de l'eNOS avec Hsp90 (Heat Shock Protein 90) et son cofacteur BH₄ (tétrahydrobioptérine 4). La perte de ces interactions découple la réaction d'oxydoréduction et entraîne la production de superoxyde (O₂⁻) à la place du NO. Le superoxyde est converti en peroxynitrite (NO₃⁻) si du NO est présent ou en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la superoxyde dismutase. L'endogline aide à l'interaction entre la NO synthase et la Hsp90 (Toporsian M. 2005). Les cellules endothéliales déficientes en endogline ou les souris hétérozygotes pour l'endogline ont un

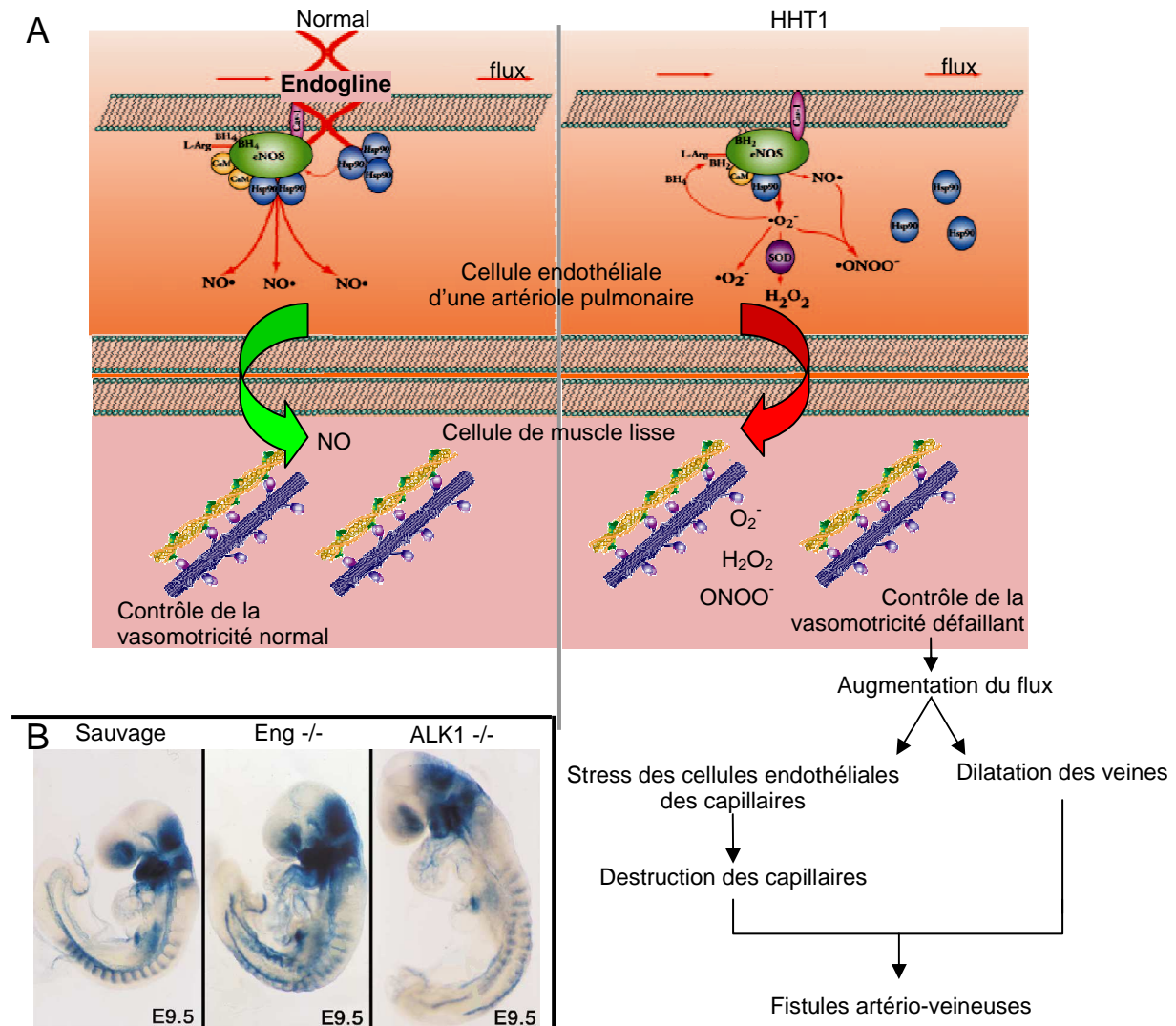


Figure 64 : Modèles moléculaires et cellulaires de HHT, suite.

A : Modèle pour HHT1 par découplage de la NO synthase. La diminution du taux d'endogline chez les patients HHT1 induit un découplage de la réaction de production du NO entraînant une vasomotricité défaillante dans les artérioles. Il en résulte un flux trop important avec une destruction des capillaires, une dilatation des veines et finalement des fistules artério-veineuses. D'après (Toporsian M. 2005).

B : Diminution de l'expression d'EphrineB2 dans les souris invalidées pour ALK1 mais pas dans les souris invalidées pour l'endogline. Il en résulte une perte de la différenciation artério-veineuse pouvant aboutir à des fistules artério-veineuses. D'après (Sorensen L. K. 2003).

découplage de la réaction de production du NO, aboutissant à la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Ces deux produits ont un effet vasodilatateur très prononcé, plus fort que celui du NO. De ce fait, la baisse du niveau de NO synthase dans les cellules déficientes en endogline est contrecarrée par la production de réactifs vasodilatateurs plus puissants. De plus, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène oxydent le BH_4 , ce qui contribue au découplage de la réaction. Au final, la baisse du niveau d'endogline découplerait la réaction de production de NO, ce qui aboutirait à la production de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène dont l'action vasodilatatrice est importante. Cette production perturberait la régulation du flux par le tonus vasculaire et induirait un flux sanguin trop important en aval des artérioles. Ce flux induirait alors des dommages dans les vaisseaux, dont la perte des capillaires et la dilatation des veines et conduirait ainsi à des fistules artério-veineuses ([figure 64A](#)) (Toporsian M. 2005). Le découplage de cette réaction par l'haploinsuffisance en endogline augmente avec l'âge dans les souris, ce qui corrèle avec l'apparition tardive des fistules (Belik J. 2009).

Une réaction inflammatoire excessive pourrait aussi être à l'origine des saignements pour HHT-1. En effet, le $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- α), cytokine proinflammatoire, réduit de moitié le niveau d'endogline à la surface des cellules endothéliales (Westphal J. R. 1993) (Li C. 2003a). Cette diminution est la conséquence d'un clivage protéolytique de l'endogline accru par un traitement au $\text{TNF-}\alpha$ (Cudmore M. 2007). Or, les sites hémorragiques des souris hétérozygotes pour l'endogline présentent une inflammation importante (Torsney E. 2003). Nous pouvons donc penser que les cytokines proinflammatoires induisent un clivage de l'endogline entraînant une diminution du taux membranaire de la protéine. Dans les sujets HHT-1 dont le taux d'endogline basal est plus faible que la normale, cette augmentation du clivage induit une zone dépourvue d'endogline ce qui entraîne les fistules artério-veineuses et les hémorragies (Mahmoud M. 2010).

Enfin, les souris invalidées pour ALK1 présentent une perte de l'expression d'EphrineB2, marqueur artériel (Sorensen L. K. 2003). Cette dérégulation n'est pas visible dans les souris invalidées pour l'endogline ([figure 64B](#)) (Sorensen L. K. 2003). Dans la vascularisation normale, EphrineB2 sur les artères et EphB4 sur les veines se répulsent. Une perte de l'expression d'EphrineB2 peut alors se traduire par une perte de la répulsion et entraîner des jonctions directes des veines sur les artères. Notons que les jonctions artério-veineuses dans la rétine des souris invalidées pour l'endogline sont de type veineux (EphB4 positives), suggérant que pour HHT-1 aussi les veines rejoignent les artères (Mahmoud M. 2010).

En résumé, il n'existe pas de modèle bien établi pour HHT. Suite à la différence entre les deux types concernant les sites des fistules artério-veineuses et à la différence interindividuelle, il est très probable qu'il existe plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à l'élaboration de fistules artério-veineuses. Les dernières études comparant les phénotypes des invalidations inductibles d'ALK1 et de l'endogline dans les cellules endothéliales de souris montrent d'ailleurs des phénotypes différents. Ces différences se retrouvent dans leur survie (les souris invalidées en post-natal pour ALK1 meurent, alors que les souris invalidées pour l'endogline en post-natal vivent) ainsi que dans l'établissement des fistules artério-veineuses suite à une blessure aiguë (trou dans l'oreille) pour les invalidées ALK1 ou suite à une blessure chronique (oreille percée avec conservation du corps étranger responsable de la blessure dans la plaie) pour les invalidées endogline (Nguyen H.-L. 2011).

1.6 Les traitements de la maladie de Rendu-Osler

Actuellement aucune thérapie ne cible les gènes défectueux dans HHT. Cependant, plusieurs essais thérapeutiques sont en cours.

Les anti-angiogéniques sont des pistes de traitement. Le bevacizumab commercialisé sous le nom d'Avastin (Genentech Inc.) est un anticorps humanisé dirigé contre toutes les isoformes du VEGF-A. Il est actuellement utilisé pour traiter certains cancers et la forme humide de la DMLA. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité de cet anticorps dans HHT. La première preuve d'efficacité potentielle de l'Avastin pour traiter HHT a été apportée lorsqu'un patient a reçu de l'Avastin pour traiter un cancer (Flieger D. 2006). Les symptômes de ce patient concernant son HHT ont alors considérablement régressé. De plus, une étude montrerait une augmentation du taux circulant de VEGF dans les patients HHT (Sadick H. 2005b) et l'associe à une augmentation de la densité microvasculaire dans HHT (Sadick H. 2005a). Un autre cas a été rapporté où une patiente en attente de transplantation hépatique a évité cette intervention suite à une réponse très favorable lors d'un traitement à l'Avastin (Mitchell A. 2008). Au vu du nombre important de communications sur le traitement de patients HHT avec de l'Avastin, lors du dernier congrès sur le Rendu-Osler (mai 2011), des publications sont attendues sur ce sujet. L'Avastin constitue donc un grand espoir thérapeutique pour les malades, même si le mécanisme d'action est encore inconnu et l'efficacité à long terme n'est pas démontrée. Il sera aussi intéressant de voir si l'Avastin est efficace pour toutes les formes de HHT ou seulement une des formes. Cette efficacité de

l'Avastin semble favoriser le modèle d'angiogenèse excessive pour expliquer l'établissement des fistules.

Une autre étude récente donne une nouvelle piste de thérapie : la thalidomide. Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase 2 pour son rôle anti-angiogénique dans certains cancers (Tseng J. E. 2001) (Figg W. D. 2001). Un patient atteint d'un cancer et de HHT a reçu de la thalidomide et a vu ses symptômes de HHT diminuer (Kurstin R. 2002) (Perez-Encinas M. 2002). Une étude franco-néerlandaise a été faite sur sept patients HHT qui ont reçu de la thalidomide (Lebrin F. 2010). Une amélioration sur la fréquence des épistaxis a été relevée. L'étude propose un mécanisme d'action de la thalidomide. Les auteurs montrent que la thalidomine induit une augmentation de la sécrétion de PDGF-B par les cellules endothéliales, notamment les "tip cells", ce qui entraîne une augmentation du recrutement des péricytes. Les vaisseaux mieux recouverts apparaissent alors plus solides d'où la diminution des saignements.

Un patient ayant subi une transplantation hépatique suivie d'une administration de FK506 (un immunosuppresseur) a vu son état (anémie, télangiectasies, saignements de nez) s'améliorer grandement. Une étude sur des cellules endothéliales en culture a montré une augmentation du taux d'ALK1 et d'endogline suite au traitement avec du FK506 (Albinana V. 2011). Ce traitement pourrait donc être administré pour combler l'haploinsuffisance des patients HHT.

Les patientes pourraient aussi être traitées avec du Raloxifène, un modulateur des récepteurs des oestrogènes, qui augmente le taux d'ALK1 et d'endogline dans les cellules endothéliales en culture (Albinana V. 2010).

Il n'y a actuellement pas d'autre thérapie médicamenteuse envisagée. Les autres traitements sont dirigés contre les symptômes (comme par exemple une supplémentation en fer ou les transfusions sanguines contre les anémies) mais ne constituent pas un véritablement traitement contre HHT.

2. L'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare (1,5 cas par million) (Rich S. 1987). L'HTAP est caractérisée par une résistance vasculaire pulmonaire chronique augmentée. Cette résistance élevée aboutit à une défaillance du cœur droit, des handicaps progressifs et au décès du patient.

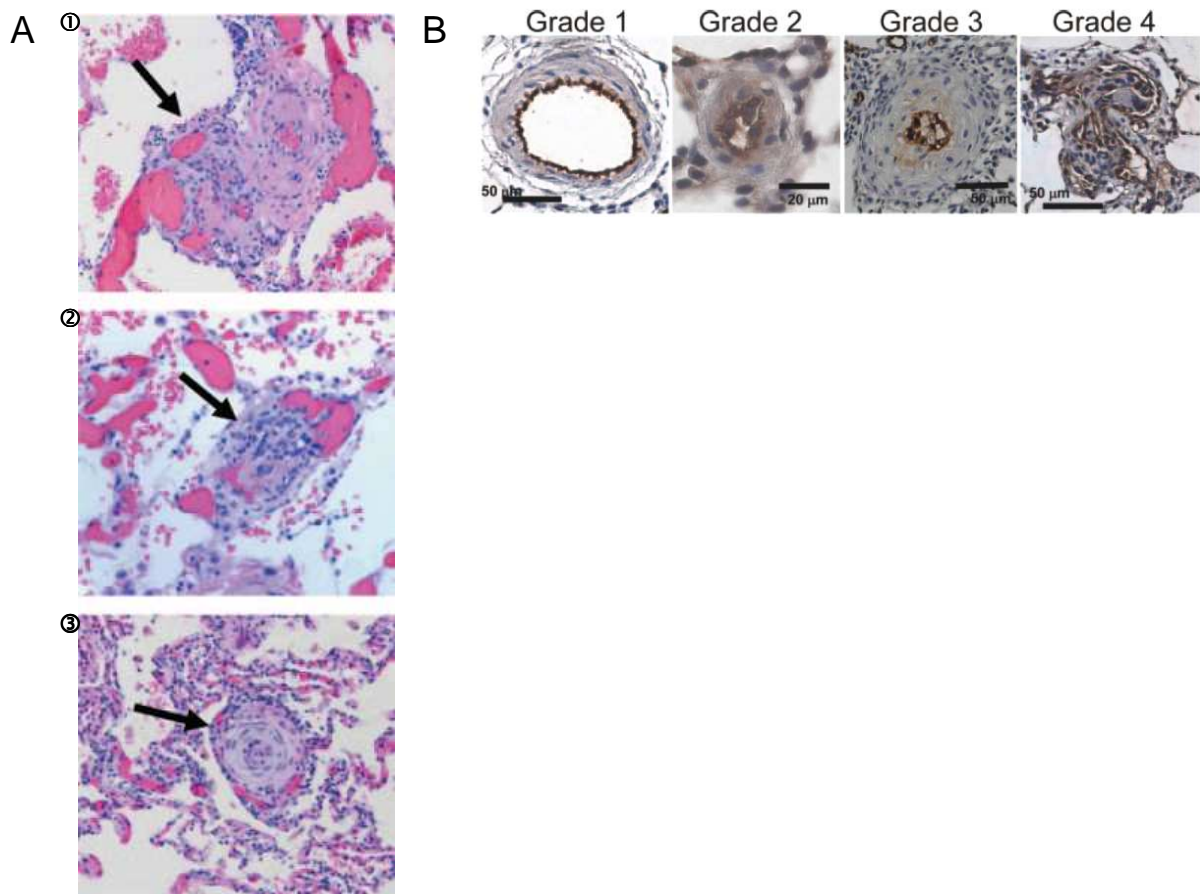


Figure 65 : Lésions vasculaires de l'hypertension artérielle pulmonaire.

A : Lésions retrouvées sur des patients atteints d'HTAP. ① Lésion pléxiforme (flèche) avec projection dans le parenchyme pulmonaire autour de l'artère. ② Section d'une lésion pléxiforme avec occlusion de la lumière de l'artère. ③ Lésion néointimale cellulaire concentrique.

B : Evolution des lésions des artères pulmonaires avec classification de Heath-Edwards. Grade 1 : Hypertrophie médiale. Grade 2 : Réaction intimale cellulaire avec prolifération. Grade 3 : Lésion néointimale laminaire concentrique. Grade 4 : Lésion pléxiforme. Marquage : facteur von Willebrand. D'après (Abe K. 2010).

2.1 Les différentes formes de la maladie

L'HTAP correspond à une maladie des petites artères pulmonaires et se caractérise par un remodelage intense de la vascularisation pulmonaire et une augmentation progressive de la résistance vasculaire pulmonaire. L'HTAP se définit par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mm de mercure au repos, ou supérieure à 30 mm de mercure en exercice (Rubin L. J. 1997). En absence de traitement, le décès du patient survient en moyenne trois ans après les premiers symptômes, suite à une défaillance du cœur droit (D'Alonzo G. E. 1991). La pathologie est due à un accroissement de la paroi vasculaire consécutive à une prolifération des cellules endothéliales et des cellules de muscle lisse, une accumulation de collagène et une nécrose fibreuse aboutissant à des lésions plexiformes (figure 65) (Pietra G. G. 1994). Les HTAP sont classées en trois grands groupes : 1) idiopathique, 2) en association avec d'autres maladies ou suite à une exposition à des facteurs environnementaux, 3) familiale (Simonneau G. 2009). Les formes idiopathiques, c'est-à-dire sporadiques, sans facteur de prédisposition ou d'histoire familiale, représentent 40 % des patients en France (Humbert M. 2006). Près de 10 % des cas résultent d'une exposition aux dérivés de fenfluramine. La moitié des cas sont associés à une autre maladie, comme des maladies des tissus connectifs, ou encore le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Enfin 4 % des cas représentent une forme familiale (Humbert M. 2006). Dans la suite de ma présentation de l'HTAP, je vais me concentrer exclusivement sur la forme familiale de la maladie.

2.2 Génétique de l'HTAP

Les premiers cas d'HTAP familiale ont été décrits dans les années 1950. L'identification du gène responsable de cette forme familiale d'HTAP a pris du temps. En 1997, un locus du chromosome 2 est montré comme impliqué (Nichols W. C. 1997), mais c'est en 2000 que le gène *BMPR2* est formellement identifié comme responsable de la maladie, sur un mode de transmission dominante (Deng Z. 2000) (Lane K. B. 2000). Une mutation de *BMPR2* est retrouvée dans 70 % des HTAP familiales. Notons que dans 9 à 40 % des cas d'HTAP idiopathique, une mutation du gène *BMPR2* est retrouvée (Thomson J. 2001).

En comparaison aux cas d'HTAP sans mutation de *BMPR2*, les porteurs de mutation présentent des symptômes hémodynamiques plus sévères, avec un déclenchement de la maladie en moyenne 10 ans plus tôt que pour les non porteurs. Le décès des patients est aussi plus tôt pour les porteurs de la mutation. De plus, les porteurs de mutations ne répondent pas aux vasodilatateurs (Sztrymf B. 2008).

La faible pénétrance (20 % des porteurs d'une mutation de *BMPR2* développent la maladie (Morrell N. W. 2006)) souligne l'importance de facteurs génétiques ou environnementaux pour le déclenchement de la maladie. Une analyse protéomique de lymphocytes provenant d'une famille porteuse d'une mutation de *BMPR2* a montré des différences entre les individus atteints et les individus porteurs sains (Meyrick B. O. 2008). Pour les patients atteints d'HTAP suite à une exposition aux fenfluramines, la durée d'exposition associée au développement de la maladie est significativement plus courte pour les personnes porteuses d'une mutation que pour les autres (Souza R. 2008). Ces éléments soulignent un concept de plusieurs "hits" pour le développement de la maladie. Les femmes sont aussi plus touchées que les hommes, suggérant un second "hit" lié au sexe.

Un autre désordre génétique pouvant aboutir à une HTAP est la maladie HHT, décrite précédemment. Des mutations d'*ACVRL1* ont été impliquées dans des cas d'HTAP. L'équipe de N. Morrell a décrit pour la première fois en 2001 un lien entre des mutations d'*ACVRL1* et l'HTAP (Trembath R. C. 2001). Dans cette étude, les signes cliniques, hémodynamiques et histologiques de l'hypertension artérielle associée à des mutations d'*ACVRL1* se sont révélés strictement identiques à ceux de l'hypertension artérielle associée à des mutations de *BMPR2*. Depuis, de nombreuses études ont confirmé la prédisposition des porteurs de mutation d'*ACVRL1* pour l'HTAP (Harrison R. E. 2003) (Abdalla S. A. 2004) (Harrison R. E. 2005) (Fujiwara M. 2008). Il semble aussi que des mutations de l'*ENG* puissent favoriser l'apparition d'une HTAP (Harrison R. E. 2003) (Chaouat A. 2004). Les symptômes sur les patients qui développent une HTAP suite à une mutation d'*ACVRL1* apparaissent en moyenne sur des patients plus jeunes (22 ans) que pour les porteurs d'une mutation de *BMPR2* (36 ans) ou pour les non porteurs de mutation (48 ans) (Girerd B. 2010). Les patients porteurs de mutation d'*ACVRL1* et qui développent une HTAP n'ont souvent pas encore de signe clinique pour HHT. Bien que les signes hémodynamiques lors du diagnostic soient généralement moins sévères pour les porteurs de mutations d'*ACVRL1*, l'évolution de la maladie est plus rapide et le pronostic plus mauvais que pour les autres cas. L'ensemble des patients porteurs d'une mutation d'*ACVRL1* ne répondent pas aux vasodilatateurs. La localisation des mutations d'*ACVRL1* retrouvées sur des patients atteints d'HTAP montre une particularité. Alors que 5

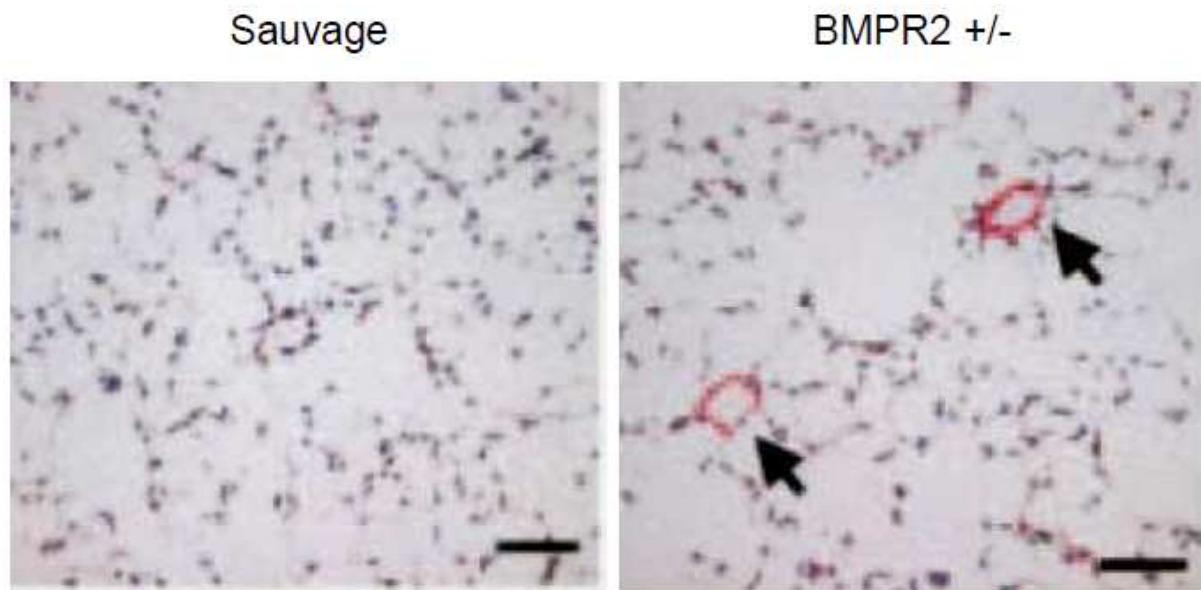


Figure 66 : Modèles animaux pour HTAP.

Les souris hétérozygotes pour BMPR2 ou sauvages sont infectées par un virus exprimant la 5-lipoxygénase. 28 jours après l'infection, les poumons des souris hétérozygotes présentent une augmentation de la couche de cellules de muscle lisse (flèche) par rapport aux souris sauvages (marquage de l'actine de muscle lisse). D'après (Song Y. 2005).

% des mutations recensées pour HHT sont dans l'exon 10 d'*ACVRL1*, un tiers des mutations recensées pour HTAP sont dans cet exon. Pour être plus précis, 22 % des mutations causant une HTAP se trouvent dans la boîte NANDOR d'ALK1 contre 3 % pour HHT (Girerd B. 2010).

Enfin, un cas d'HTAP a été décrit sur un patient porteur d'une mutation non-sens de *Smad8* (Shintani M. 2009). Cette mutation entraîne une perte de l'activité de la protéine encodée, puisque ce mutant ne peut pas être phosphorylé par ALK3 ou ALK1 constitutivement actif et n'est pas capable de se lier à Smad4. Il s'agit donc d'une mutation perte de fonction qui montre un lien direct entre la voie Smad et la maladie.

2.3 Modèles animaux d'étude de l'HTAP

Il existe plusieurs modèles animaux pour l'HTAP. Les premiers modèles étaient des souris *BMPR2* +/- . Trois équipes les ont étudiées. Dans une première étude, les souris présentent une HTAP et s'adaptent moins à une situation d'hypoxie (Beppu H. 2004). Un second groupe étudia les souris hétérozygotes sans trouver un phénotype en absence de stimulation (Song Y. 2005). Par contre, l'infection des souris par un adénovirus encodant la 5-lipoxygénase crée une inflammation et induit une HTAP dans les souris hétérozygotes ([figure 66](#)). La troisième étude n'a pas détecté d'HTAP de base dans les souris, mais les souris développent une HTAP en réponse à un traitement à la sérotonine (Long L. 2006). Notons que les souris de ces trois études dans un fond génétique C57BL/6 sont les mêmes, le premier groupe ayant donné les souris aux autres groupes. La faible pénétrance chez l'homme peut expliquer la difficulté de détecter un phénotype sur les souris hétérozygotes. Une diminution de 70 à 90 % de l'expression de *BMPR2* réalisée grâce à un shRNA n'aboutit pas non plus à une HTAP mais plutôt à un phénotype HHT (vaisseaux dilatés) (Liu D. 2007). Ceci implique bien un second "hit" absolument nécessaire pour le développement de l'HTAP, tandis que la diminution de la voie BMP seule aboutit à un phénotype HHT (les degrés de gravité pouvant être la conséquence d'un second "hit"). La surexpression inductible d'un mutant dominant-négatif dans les cellules de muscle lisse aboutit à une augmentation de la pression artérielle pulmonaire. Cette étude permet de penser que l'HTAP est un problème des cellules de muscle lisse et non des cellules endothéliales (West J. 2004). Cependant, le lien entre les mutations d'*ACVRL1* et HTAP sous-entend un défaut des cellules endothéliales. De plus, une récente étude du groupe de P. Oh a montré un rôle des cellules endothéliales dans l'HTAP

(Hong K. H. 2008). En effet, en induisant une invalidation totale ou hétérozygote de *BMPR2* dans les cellules endothéliales, et plus particulièrement dans l'endothélium pulmonaire par induction de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur L1 déjà présenté, ce groupe a obtenu des souris qui développent une HTAP entre 2 et 7 mois. Les vaisseaux pulmonaires des souris présentent une augmentation du nombre de cellules endothéliales et de cellules de muscle lisse. Il semble donc que l'HTAP soit une maladie des cellules de muscle lisse et des cellules endothéliales.

2.4 Etudes fonctionnelles de mutations impliquées dans l'HTAP

Les mutations de *BMPR2* retrouvées dans l'HTAP sont en grande majorité (environ 70 % des cas) des mutations aboutissant à une protéine tronquée. Les mutations faux-sens sont retrouvées dans le domaine extracellulaire, le domaine kinase et la queue cytoplasmique. Cette dernière représente un domaine spécifique de *BMPR2* de par sa longueur (plus de 500 acides aminés).

Dans l'ensemble des études publiées actuellement, les auteurs ont étudié lors de la surexpression de mutants *BMPR2* les voies de signalisation Smad et/ou p38. Cependant, aucune étude n'a étudié la phosphorylation de récepteurs de type 1 par les mutants de *BMPR2*, alors que la fonction première d'un récepteur de type 2 est de phosphoryler les récepteurs de type 1 et non de phosphoryler les voies de signalisation. Les études apportent donc une preuve indirecte de l'activité des mutants de *BMPR2*. La première étude fonctionnelle de mutants de *BMPR2* a été réalisée en 2001 par l'équipe de W. Nichols (Machado R. D. 2001). Cette étude teste l'activité de deux mutants : une mutation du domaine kinase et une mutation de la queue cytoplasmique. Les auteurs trouvent alors que ces deux mutants n'induisent pas une activation de la voie Smad lors d'une stimulation par BMP4 et proposent l'haploinsuffisance comme modèle moléculaire. Cependant, deux études indépendantes publiées en 2002 contredisent leurs résultats. Dans l'étude du groupe de K. Miyazono, les auteurs étudient cinq mutations : une mutation faux-sens sur une cystéine du domaine extracellulaire, deux mutations faux-sens dont une sur une cystéine du domaine kinase et deux mutations entraînant une protéine tronquée de la queue cytoplasmique (Nishihara A. 2002). L'activité des mutants est étudiée par les surexpressions de ces mutants et d'ALK3 avec stimulation par BMP2. Curieusement, les quantités de plasmide utilisées sont différentes suivant les mutants utilisés, ce qui implique

une différence dans le niveau d'expression de ces mutants. Néanmoins, les auteurs montrent que les mutants du domaine extracellulaire et du domaine kinase n'induisent pas la voie Smad en réponse à BMP2, alors que les mutants de la queue cytoplasmique ont une activité kinase comparable à BMPR2 sauvage. Les auteurs ont même utilisé un mutant dépourvu totalement de la queue cytoplasmique de BMPR2 et obtiennent une activation de la voie Smad avec ce mutant. Concernant l'effet dominant-négatif de ces mutants, une cotransfection avec ALK3, BMPR2 sauvage et les mutants est réalisée. Dans cette étude aussi de manière surprenante les quantités de plasmide utilisées varient entre les mutants, et le ratio BMPR2 sauvage/BMPR2 muté n'est pas constant. Difficile dans ces conditions de pouvoir comparer l'effet de BMPR2 muté sur l'activité de la forme sauvage. Les auteurs concluent à un effet dominant-négatif pour le mutant extracellulaire et le mutant kinase sur la cystéine, l'effet dominant-négatif de l'autre mutant du domaine kinase étant peu clair. La localisation cellulaire des mutants est étudiée grâce à un marquage fluorescence de l'étiquette myc des mutants. Les auteurs montrent que lorsqu'une cystéine est mutée, que ce soit dans le domaine extracellulaire ou même le domaine intracellulaire, la protéine mutée ne peut pas rejoindre la membrane plasmique et est donc inactive. Dès lors, l'effet dominant-négatif observé pour ces deux mutants est à remettre en question. En conclusion, cette étude montre que les mutations de *BMPR2* ont différentes conséquences sur l'activité de la protéine résultante. Les mutants sur des cystéines ne parviennent pas à la membrane plasmique, les mutants faux-sens du domaine kinase ont un défaut dans l'activité enzymatique, tandis que les mutants tronqués de la queue cytoplasmique apparaissent normaux. La seconde étude de 2002 est celle du groupe de N. Morrell (Rudarakanchana N. 2002). Ils ont étudié quatorze mutations faux-sens : quatre mutations du domaine extracellulaire (toutes sur des cystéines), six du domaine kinase (dont trois sur des cystéines), et quatre de la queue cytoplasmique. Utilisant des mutants couplés à la GFP, les auteurs montrent que les mutants du domaine extracellulaire ne peuvent pas atteindre la membrane plasmique, sont dépourvus d'activité en réponse à une stimulation par BMP4, et ne lient pas ¹²⁵I-BMP4. Ces résultats confirment ceux de l'étude décrite précédemment. Concernant les mutants du domaine kinase, les mutants sur des cystéines n'atteignent pas la membrane plasmique, sont inactifs en réponse à BMP4 et ne lient pas ¹²⁵I-BMP4. Ces résultats sont aussi en adéquation avec l'étude précédente. Par contre, les mutants du domaine kinase qui ne sont pas sur des cystéines atteignent la membrane plasmique, lient le ligand radioactif mais n'induisent pas la signalisation Smad. Enfin, les mutants de la queue cytoplasmique atteignent la membrane plasmique, lient le ligand et induisent la phosphorylation de la voie Smad en réponse à une stimulation par BMP4. Jusqu'ici, les

résultats sont en totale corrélation avec ceux de l'équipe de K. Miyazono. Les auteurs ont alors étudié la voie p38, voie non canonique pouvant être activée par les BMPs. Ils montrent alors que le niveau de phosphorylation de p38 ne varie pas lors d'une stimulation par BMP4 lorsque les mutants de *BMPR2* sont surexprimés (quel que soit le mutant étudié), alors que *BMPR2* sauvage induit une phosphorylation de p38 en réponse à BMP4. Les auteurs concluent alors à une activation par les mutants de la voie p38 ligand-indépendante. Pourtant, les mutants dont la kinase est altérée ou qui ne peuvent rejoindre la membrane plasmique et qui sont donc séquestrés dans le réticulum endoplasmique ne peuvent pas induire la voie p38. De plus, aucune publication ne fait état d'une phosphorylation directe de p38 par *BMPR2*. Il faudrait donc imaginer que les mutants ne puissent pas activer les récepteurs de type 1 pour la voie Smad, mais pourraient activer les récepteurs de type 1 pour la voie p38 en l'absence de ligand. Ces résultats sont donc très critiquables. Le groupe de P. Knaus a publié, toujours en 2002, un article sur le rôle de la queue cytoplasmique de *BMPR2* dans l'activité de ce récepteur (Nohe A. 2002). Réalisant plusieurs récepteurs tronqués, les auteurs montrent qu'un récepteur sans domaine kinase ni queue cytoplasmique est dépourvu d'activité en réponse à BMP2 (sur l'activation de la voie Smad et p38). Cependant, un mutant dépourvu de la queue cytoplasmique peut en effet induire la voie Smad, mais pas la voie p38. Ces résultats indiquent plutôt une perte d'activation de la voie p38 par les mutants de la queue cytoplasmique en réponse à un ligand et non une activation constitutive. La queue cytoplasmique interagirait avec des protéines cytoplasmiques permettant l'induction de la voie p38 et en cas de mutations ou de troncation, cette interaction disparaîtrait, entraînant la perte d'induction de la voie. Ces résultats suggèrent que l'HTAP serait une conséquence d'une voie p38 altérée et non de la voie Smad. Néanmoins, BMP4 inhibe la prolifération des cellules de muscle lisse par une voie indépendante de p38 (Yu P. B. 2008).

Une étude de 2005 est particulièrement intéressante puisqu'elle utilise des cellules de muscle lisse de patients (Yang X. 2005). Ces cellules proviennent de trois patients porteurs d'une mutation ponctuelle de *BMPR2*, deux dans le domaine kinase et un dans la queue cytoplasmique. Le niveau de P-Smad1, en réponse à une stimulation par BMP4, en comparaison à des cellules provenant de personnes saines, est très faible dans les cellules des patients dont la mutation est dans le domaine kinase, et réduite dans les cellules du patient dont la mutation est sur la queue cytoplasmique. L'inhibition de la prolifération induite par BMP4 est largement altérée dans les cellules de patients avec la mutation du gène *BMPR2*, mais aussi dans les cellules de patients atteints d'HTAP sans mutation de ce gène. Cette étude montre un rôle clé de la voie des BMPs, même dans les cas d'HTAP idiopathique. Ces

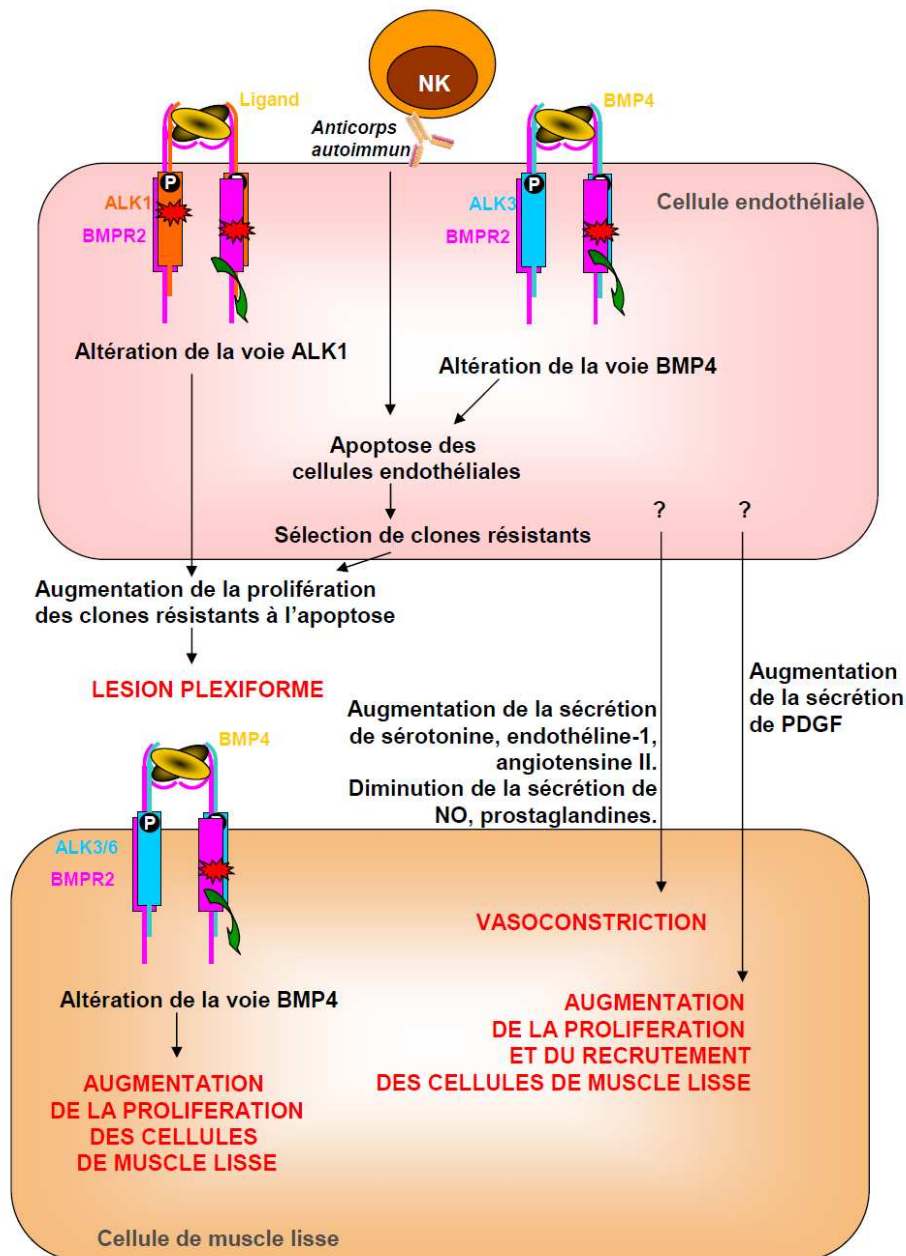


Figure 67 : Modèle moléculaire et cellulaire de HTAP.

La diminution de la voie de BMP4 suite aux mutations de BMPR2 ou à la diminution du taux de BMPR2 amoindrit la protection contre l'apoptose des cellules endothéliales et l'effet anti-prolifératif de BMP4 sur les cellules de muscle lisse. Le système immunitaire peut induire l'apoptose des cellules endothéliales (NK : Lymphocytes Natural Killer). Les clones de cellules endothéliales résistantes à l'apoptose prolifèrent suite à une diminution de la voie ALK1 et forment les lésions plexiformes. La sécrétion de facteurs vasodilatateurs par les cellules endothéliales est diminuée, tandis que la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs augmente. Ceci conduit à une constriction des vaisseaux. La sécrétion de PDGF augmente induisant le recrutement excessif de cellules de muscle lisse.

résultats confirment ceux d'une étude sur des poumons de patients atteints d'HTAP, prélevés lors d'une transplantation. Ces travaux ont permis de montrer une baisse de l'expression de *BMPR2* dans la vascularisation des poumons, même dans les poumons de cas idiopathiques sans mutation du gène (Atkinson C. 2002). La voie *BMPR2* apparaît donc diminuer dans tous les cas d'HTAP.

En conclusion, les études fonctionnelles des mutations de *BMPR2* n'apportent pas encore un modèle moléculaire clair pour l'HTAP. Les conséquences des mutations sont différentes en fonction des domaines affectés. Une meilleure compréhension du rôle de la queue cytoplasmique apparaît indispensable, ainsi que des interactions entre ce domaine et les protéines cytoplasmiques. Plusieurs interactions ont été décrites, comme avec LIMK1 (régulateur du cytosquelette) (Foletta V. C. 2003) ou Tctex-1 (une composante de la protéine moteur Dynein) (Machado R. D. 2003) ou encore Trb3 (TRiBbles like protein 3, protéine qui entraîne la dégradation de Smurf1 et augmente ainsi la voie des BMPs) (Chan M. C. 2007). Leur implication dans l'HTAP par contre n'est pas établie. Enfin, en prenant en compte les cas d'HTAP consécutifs à une mutation d'ALK1, il serait intéressant d'étudier l'effet des mutations de *BMPR2* sur l'activation d'ALK1 en réponse à BMP9.

2.5 Modèle moléculaire et cellulaire de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par un remodelage vasculaire, la formation de thromboses et une inflammation à des degrés divers (Tuder R. M. 2007). Le remodelage vasculaire est la conséquence d'une hyperprolifération couplée à une augmentation de la survie des cellules de muscle lisse (Rubin L. J. 1997), aboutissant à une hypertrophie de la média, des lésions de l'intima et un épaississement de l'adventis (Atkinson C. 2002). L'altération de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales entraîne la formation de lésions plexiformes (figure 65) (Sakao S. 2005). Ces lésions pourraient être la conséquence d'une apoptose précoce des cellules endothéliales par diminution de la voie des BMPs (BMP4 protégeant les cellules endothéliales de l'apoptose (Teichert-Kuliszewska K. 2006)). Des clones de cellules endothéliales résistant à l'apoptose survivent alors, formant ces lésions plexiformes (figure 67).

Les dysfonctions endothéliales conduisent à une modification de la sécrétion des facteurs contrôlant le tonus vasculaire. Dans la circulation pulmonaire de personnes saines, les

facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs relargués localement ou circulant sont finement régulés. Dans l'HTAP, plusieurs facteurs sont dérégulés. L'endothéline-1 (Cacoub P. 1993), l'angiotensine II (Hoepfer M. M. 2002) et la sérotonine (Eddahibi S. 2001) sont des facteurs vasoconstricteurs dont les niveaux sont augmentés dans la pathologie. Inversement, les prostaglandines (Tuder R. M. 1999) et l'oxide nitrique (Giaid A. 1995) sont des vasodilatateurs diminués dans la pathologie (figure 67). Ces facteurs constituent des cibles thérapeutiques importantes. Notons que l'endothéline-1 est induite par la voie BMP9/ALK1 sur les cellules endothéliales (Star G. P. 2010). Cette voie étant altérée dans l'HTAP, il est suprenant de retrouver un taux d'endothéline-1 élevé chez les patients HTAP.

La formation de thromboses est la conséquence d'un dérèglement de la fonction plaquettaire, aboutissant à un état procoagulant (Johnson S. R. 2006). Les anticoagulants peuvent être utilisés en traitement.

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'HTAP sont encore peu clairs. Néanmoins, une étude a montré que les cellules endothéliales de patients en culture sécrètent des facteurs augmentant la prolifération des cellules de muscle lisse de ces patients (Eddahibi S. 2006). Parmi ces facteurs, la sérotonine explique à 60 % l'hyperprolifération des cellules de muscle lisse qui ont reçu le milieu de culture des cellules endothéliales des patients. Il semble donc que l'HTAP soit une maladie où les cellules endothéliales dérégulent la croissance des cellules de muscle lisse par une sécrétion paracrine de facteurs de croissance anormale. Les cellules endothéliales de patients sécrètent aussi un taux plus élevé de PDGF, facteur de croissance et de recrutement des cellules de muscle lisse (Perros F. 2008).

Les cytokines proinflammatoires pourraient induire une HTAP avec notamment une infiltration importante des cellules du système immunitaire dans les tissus atteints (Dorfmüller P. 2003) (Perros F. 2007). Des anticorps autoimmuns, dirigés contre les cellules endothéliales et entraînant leur apoptose, sont aussi détectés chez des patients, suggérant fortement un rôle du système immunitaire dans le développement de la pathologie (figure 67) (Tamby M. C. 2005).

En résumé, le mécanisme moléculaire de développement de l'HTAP n'est pas connu et il semble vraisemblable que plusieurs mécanismes existent. A l'heure actuelle de nos connaissances, les dysfonctions premières pourraient se passer sur les cellules endothéliales. Une apoptose des cellules endothéliales par diminution de la voie des BMPs (diminution du taux de BMPR2, mutations de *BMPR2* ou *ACVRL1*) ou par action du système immunitaire conduit à des lésions plexiformes. De plus, les facteurs sécrétés par les cellules endothéliales

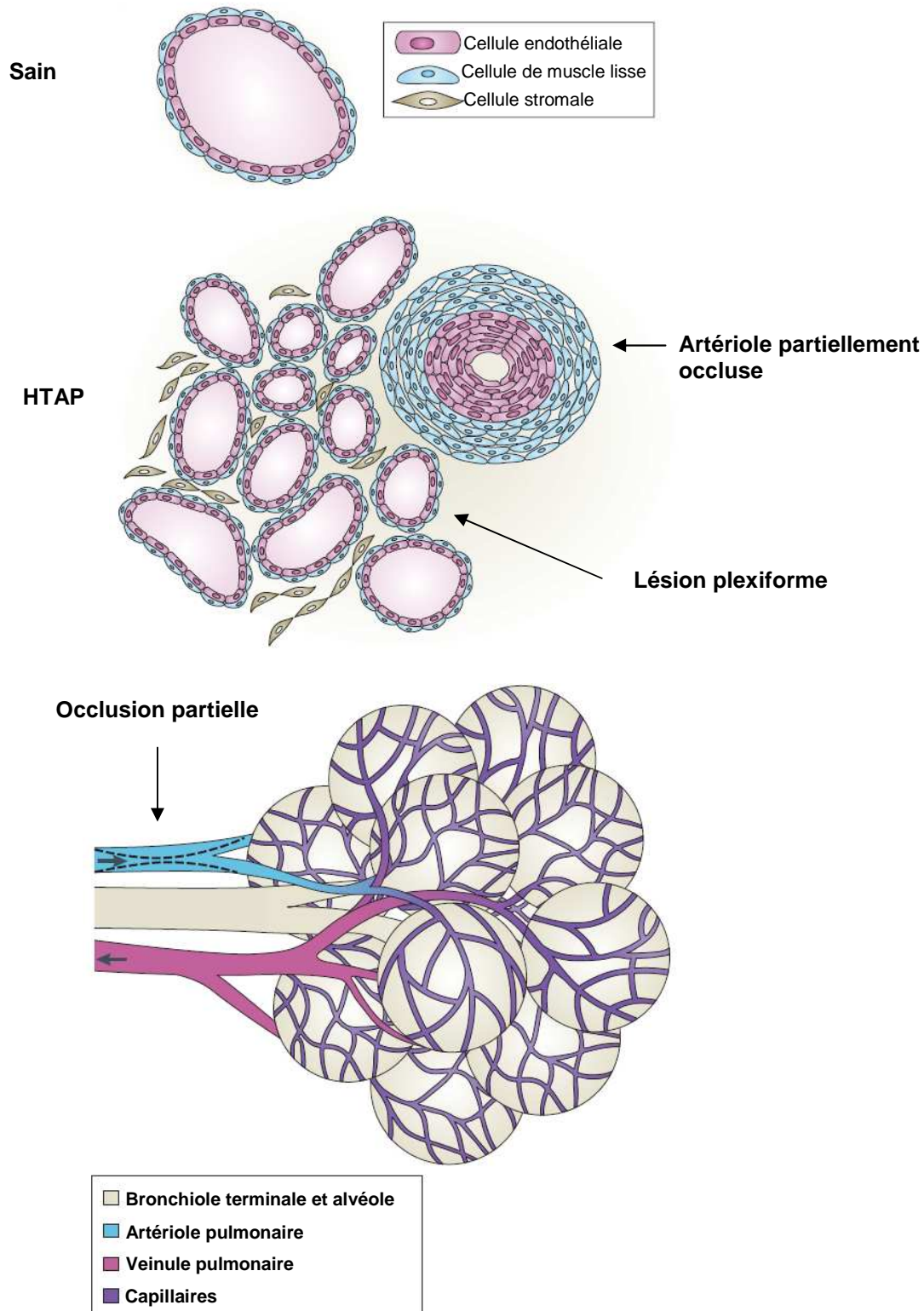


Figure 68 : Remodelage vasculaire dans l'HTAP.
D'après (ten Dijke P. 2007).

contrôlant le tonus vasculaire sont dérégulés avec une balance favorable aux facteurs vasoconstricteurs. La cause dans le dérèglement de ces facteurs du tonus vasculaire n'est pas identifiée à ce jour. Les cellules endothéliales sécrètent aussi en excès des facteurs favorisant la croissance des cellules de muscle lisse comme le PDGF, s'ajoutant à la baisse de la voie des BMPs dans ces cellules de muscle lisse, qui prévient normalement la croissance excessive de ces cellules. Au final, les vaisseaux pulmonaires ont un endothélium altéré et une couche de cellules murales épaissie, entraînant une diminution de la lumière des vaisseaux, une augmentation de la résistance au flux et donc une élévation de la pression pulmonaire (figure 68). Cette élévation conduit à un travail du cœur droit excessif qui peut conduire à une défaillance cardiaque fatale.

2.6 Les traitements de l'HTAP

Il n'existe actuellement pas de traitement totalement efficace à cette pathologie. La limitation des efforts physiques est la première mesure à appliquer (Rubin L. J. 1997). Les diurétiques avec un régime sans sel peuvent diminuer la surcharge ventriculaire droite (Montani D. 2005). Les anticoagulants diminuent aussi les thromboses et permettent une meilleure survie des patients (Johnson S. R. 2006). Les traitements visant la voie des prostaglandines (par injection intraveineuse continue de la prostacycline ou par administration d'analogues de la prostacycline), de l'oxyde nitrique et de l'endotheline-1 permettent de prolonger la vie du patient dans de meilleures conditions de vie (Humbert M. 2004). Cependant, le manque de compréhension du mécanisme moléculaire rend le développement de molécules thérapeutiques difficile. La transplantation pulmonaire reste aujourd'hui la seule thérapie efficace (Pielsticker E. J. 2001).

Objectifs

Objectifs

Ma thèse a débuté juste après l'identification de BMP9 et BMP10 comme ligand physiologique d'ALK1. Cette découverte a marqué un tournant majeur dans l'étude de la signalisation d'ALK1, de son activité cellulaire ainsi que de son implication dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. BMP9 est circulante à des doses biologiquement actives. Aucune preuve ne permet de penser que BMP10 est circulante, son expression semblant principalement restreinte au cœur. BMP9 semble donc être le ligand responsable de l'activation d'ALK1 *in vivo*.

Objectif général de la thèse : poursuivre l'étude du rôle de BMP9 à différentes échelles : du moléculaire aux modèles *in vivo*.

1) BMP9 : outil diagnostique dans la maladie de Rendu-Osler.

ALK1 est un récepteur membranaire muté dans la maladie de Rendu-Osler de type 2. La découverte de BMP9 en tant que ligand physiologique d'ALK1 a ouvert des possibilités d'étude moléculaire pour cette pathologie jusqu'alors impossible. Mon premier projet de thèse a donc consisté à étudier l'activité de différents mutants d'ALK1 en réponse à BMP9 et de mettre au point un test diagnostique pour discriminer les polymorphismes rares des mutations pathologiques.

2) Structure du complexe ALK1/BMP9.

L'affinité de BMP9 pour ALK1 est largement supérieure aux affinités des autres BMPs pour leurs récepteurs. Mon second projet de thèse consistait alors à produire le domaine extracellulaire d'ALK1 et la forme mature de BMP9 afin de pouvoir réaliser la structure du complexe et d'en déduire ainsi le mode de liaison de BMP9 sur ALK1. Ce projet doit nous permettre à plus long terme de proposer un peptide agoniste de BMP9.

3) Analyse de l'angiogenèse des souris BMP9 -/-.

Mon troisième projet se porte à l'échelle d'un organisme entier avec l'étude du phénotype de la souris invalidée pour BMP9. Cette étude comporte l'analyse de l'angiogenèse physiologique mais aussi de l'angiogenèse tumorale.

Résultats

Résultats

Projet 1 : BMP9 : outil diagnostique dans la maladie de Rendu-Osler.

Contexte de l'étude

Les mutations du gène *ACVRL1* sont responsables de deux maladies vasculaires : la maladie de Rendu-Osler de type 2 (HHT-2) (Johnson D. W. 1996) et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (Trembath R. C. 2001).

Le premier modèle de signalisation d'ALK1 était un hétérodimère ALK1/ALK5 liant TGF- β 1 et activant les deux voies Smad (Goumans M. J. 2002). En suivant ce modèle, plusieurs équipes ont étudié les conséquences fonctionnelles des mutations d'ALK1 en réponse à TGF- β 1 (Lux A. 1999) (Harrison R. E. 2003) (Gu Y. 2006) (Fernandez L. A. 2006). L'ensemble des résultats de ces travaux n'ont pas permis d'établir un modèle moléculaire de HHT-2. En effet, tous les mutants ne présentent pas la même activité en réponse à TGF- β 1, certains étant totalement inactifs, d'autres gardant la possibilité d'activer la voie Smad1/5/8. Cette hétérogénéité des réponses des mutations à une stimulation au TGF- β 1 n'a pas permis l'établissement d'un modèle moléculaire clair pour HHT-2 et ne permet pas de mettre au point un test moléculaire de fonctionnalité discriminant les mutations pathologiques des polymorphismes rares. Cependant, la contestation de TGF- β 1 en tant que ligand d'ALK1 et la capacité d'ALK5 à activer la voie Smad1/5/8 sans ALK1 (Wrighton K. H. 2009b) remettent en cause la validité des résultats de ces études.

La découverte de nouveaux ligands d'ALK1, BMP9 et BMP10 (David L. 2007a) a ouvert des possibilités nouvelles dans les études fonctionnelles de mutations d'*ACVRL1*, afin de pouvoir proposer un modèle d'étude de la maladie. De plus, la présence de BMP9 dans le sérum nous a incités vivement à étudier la fonctionnalité des mutations d'*ACVRL1* en réponse à BMP9 (David L. 2008).

Objectifs de l'étude

- 1) Analyser les conséquences fonctionnelles des différentes mutations d'ALK1.
- 2) Proposer un modèle moléculaire de HHT-2.
- 3) Discriminer les mutations pathogènes des polymorphismes rares pour le conseil génétique aux familles HHT.

Méthodologie

ALK1 étant exprimé uniquement dans les cellules endothéliales, il est très difficile d'avoir accès à des cellules de patients HHT-2 exprimant ALK1 muté. La stratégie de l'étude a donc consisté à surexprimer ALK1 WT ou des formes mutées d'ALK1, retrouvées sur des patients HHT-2 et recrées par mutagenèse dirigée, dans des cellules dépourvues d'ALK1 endogène (NIH/3T3 ou Cos7).

Les cellules transfectées m'ont permis : 1) d'étudier la localisation cellulaire d'ALK1 mutée, 2) de mesurer la capacité des récepteurs mutés à fixer BMP9, 3) d'analyser l'activité kinase de ces mutants en réponse à BMP9, 4) d'étudier l'effet de ces mutants sur l'activité de l'allèle sauvage (étude d'un effet dominant-négatif) en recréant une cellule exprimant un allèle muté et un allèle sauvage et mimant ainsi une cellule hétérozygote comparable à celle des patients, 5) d'étudier l'impact fonctionnel de mutant de la queue NANDOR, mutations très fréquentes dans l'HTAP et pouvant donc avoir des conséquences fonctionnelles particulières, 6) d'établir un test diagnostique pour le conseil génétique aux familles.

Pour étudier l'activité kinase des récepteurs, nous avons réalisé des western blots avec un anticorps anti-P-Smad1/5. Afin d'obtenir une mesure plus quantitative, nous avons utilisé un test biologique de mesure de la voie Smad1/5/8. Le test est basé sur l'activation d'un élément de réponse à cette voie Smad, appelé BRE pour BMP Responsive Element, cloné devant le gène de la luciférase. En cotransfectant ce plasmide avec un plasmide codant pour ALK1 (WT ou mutée) dans des cellules dépourvues d'ALK1 endogène, nous obtenons des cellules qui vont exprimer la luciférase lorsque la voie Smad1/5/8 sera activée. L'activation de la voie Smad par BMP9 via le récepteur ALK1 est alors quantifiable. Une transfection avec le

gène de la β -galactosidase à la place du gène ALK1 permet de vérifier que l'activation de la voie Smad par BMP9 passe uniquement par ALK1.

En collaboration avec le service de génétique moléculaire et génétique de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon, nous avons sélectionné des mutations ponctuelles retrouvées sur des patients HHT-2 sur l'ensemble des domaines d'ALK1 : domaine extracellulaire, boîte GS, domaine kinase et queue NANDOR. Nous avons aussi sélectionné une mutation aboutissant à une protéine tronquée, car cette mutation est retrouvée fréquemment en France suite à un effet fondeur (Lesca G. 2008).

Résultats

Les résultats ont été publiés dans *Blood*, 2010, 116 (9), 1604-1612.

J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans cet article.

Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel *ACVRL1* mutations

Nicolas Ricard,¹⁻³ Marie Bidart,¹⁻³ Christine Mallet,¹⁻³ Gaetan Lesca,^{4,5} Sophie Giraud,⁴ Renaud Prudent,⁶ Jean-Jacques Feige,¹⁻³ and Sabine Bailly¹⁻³

¹Inserm, U878, Grenoble; ²Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant/Laboratoire Angiogenèse et Physiopathologie Vasculaire, Grenoble; ³Université Joseph Fourier, Grenoble; ⁴Service de Génétique Moléculaire et Clinique, Hôpital Edouard Herriot, Lyon; ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon; and ⁶Laboratoire de Transduction du Signal, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Grenoble, France

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is an autosomal dominant genetically inheritable vascular dysplasia caused by mutations in genes encoding receptors of the transforming growth factor- β (TGF- β) family: *ENG*, encoding endoglin (HHT1), and *ACVRL1*, encoding activin receptor-like kinase-1 (ALK1; HHT2). Our recent discovery of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) as the specific ligand for ALK1 allowed us to reevaluate the functional significance of *ACVRL1* mutations. We generated 19 ALK1

mutants reproducing HHT2 mutations (4 were novel mutations) found throughout the protein. We show that all ALK1 mutant proteins were expressed by transfected cells; most of them were present at the cell surface and retained their ability to bind BMP9 (except for the extracellular mutants). However, most were defective in BMP9 signaling. None of the ALK1 mutants had a dominant negative effect on wild-type ALK1 activity. These data demonstrate that mutations of *ACVRL1* fit with a functional haploin-

sufficiency model affecting BMP9 signaling. Our study also identified 4 *ACVRL1* mutations (D179A, R386C, R454W, and A482V) that did not alter the BMP9 responses that are polymorphisms and 2 novel mutations that are pathogenic (L381P and I485F). This demonstrates that the analysis of BMP9 responses can be used as a diagnostic tool by geneticists confronted with novel or conflicting *ACVRL1* mutations. (*Blood*. 2010; 116(9):1604-1612)

Introduction

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT, Rendu-Osler disease) is an autosomal dominant genetically inheritable vascular dysplasia. HHT affects approximately 1 in 8000 persons, and approximately 1.2 million people worldwide have HHT. The clinical features of the disorder include recurrent nosebleeds, mucocutaneous telangiectases, and arteriovenous malformations in lung, liver, and central nervous system. HHT is caused by germline mutations in 1 of 2 major genes: *ENG*, encoding endoglin, and *ACVRL1*, encoding activin receptor-like kinase type 1 (ALK1), respectively, defining the HHT1 and HHT2 clinical variants.^{1,2} Mutations have also been identified in *MADH4* that encodes Smad4 in a subset of families with combined juvenile polyposis and HHT, and there is evidence for the existence of 2 other HHT-associated genes.³⁻⁵ *ACVRL1* and *ENG* mutations are currently found in 80% to 90% of patients with a definite clinical diagnosis.⁶ HHT displays wide allelic heterogeneity, and more than 600 mutations have been reported in the HHT mutation database (www.hhtmutilation.org). Mutations in *ACVRL1* or *ENG* are distributed over the entire coding sequence. Mutations can also be found in intronic splice sites of both genes. Large deletions or duplications, from single exons to the whole gene, have also been reported.⁷⁻⁹

The mechanisms by which these mutations cause HHT are not yet clearly understood. The different manifestations vary considerably, even among members of the same family sharing the same mutation; to date, disease severity has not been associated with specific mutations.^{7,10} HHT1 patients express

reduced levels of endoglin.^{11,12} HHT1 is therefore the result of haploinsufficiency.¹³ Similarly, haploinsufficiency may account for HHT2, although the abundance of missense mutations affecting exons 7 and 8 suggests abnormal function of certain ALK1 proteins. ALK1 expression has been measured in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by fluorescence-activated cell sorter (FACS) or metabolic labeling and immunoprecipitation and has been found to be reduced in 3 patients with *ACVRL1* missense mutant codons (G48E/A49P, W50C, and S333I) and to be normal in 1 patient with an in-frame deletion (S232del).¹⁴ However, the number of patients is too small to definitively conclude that HHT2 is really the result of haploinsufficiency.

Endoglin and ALK1 are components of a transforming growth factor- β (TGF- β) family receptor complex that are primarily expressed on endothelial cells. Endoglin is a type III receptor with no kinase activity that enhances ligand binding to its signaling receptors. ALK1 is 1 of 5 different type I receptors of the TGF- β family that act downstream of the type II receptors and determine the signaling specificity by recruiting receptor-Smads. ALK1 promotes Smad1 and Smad5 phosphorylation. The ALK1 receptor had long been considered an orphan receptor. However, we recently identified bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 as ligands for ALK1.¹⁵ These data were subsequently confirmed by another group.¹⁶ Furthermore, we could establish that BMP9, but not BMP10, is present in human plasma and contributes to adult vascular quiescence.¹⁷

Submitted March 29, 2010; accepted April 26, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 25, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-276881.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge

payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

The discovery of BMP9 as a specific ligand for ALK1 may represent a significant step in understanding HHT as it allows us to reconsider the molecular mechanisms behind the disease pathogenesis.¹⁸ The aim of the present study was to evaluate the functional significance of *ACVRL1* mutations found in HHT2 patients using BMP9 as a ligand. We generated 19 ALK1 mutants corresponding to 15 previously described mutations and 4 novel mutations. These mutations were distributed throughout different regions of the protein. We found that all the ALK1 mutant proteins were expressed and that most of them were present at the cell surface and retained their ability to bind BMP9 (except for the extracellular mutations). However, most were defective in BMP9 signaling. Furthermore, none of the ALK1 mutant behaved as a dominant negative receptor by inhibiting signaling through the wild-type receptor. This study suggests that HHT2 follows a model of functional haploinsufficiency in which the BMP9 response in heterozygotic patients is decreased by 50% because of the loss of 1 functional allele. We also demonstrated that analysis of the BMP9 response could discriminate pathogenic (L381P, I485F) from polymorphic (D179A, R386C, R454W) *ACVRL1* mutations. This further demonstrates that the study of the BMP9 response through the BRE-luciferase reporter gene activity will be a useful tool for molecular geneticists.

Methods

Cell line

NIH-3T3 fibroblasts and COS-7 cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium, 4.5 g/L glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest; Abcys).

DNA constructs

ALK1 mutants were generated by polymerase chain reaction through site-directed mutagenesis of the WT-ALK1 plasmid cloned in pcDNA3 (kindly provided to us by Dr C. H. Heldin, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) using the Stratagene QuikChange kit.

Fifteen mutations found in HHT2 patients throughout the *ACVRL1* gene were selected (Figure 1A; Table 1). Fourteen were missense mutations: 3 were in the extracellular domain (C51Y, C77W, and N96D); 1 was located in the intracellular GS (glycine/serine rich) region, a helix-loop-helix structure proximal to the kinase domain (D179A); and 10 were located in the intracellular kinase domain (A347P, R374W, R374Q, R411Q, R411W, R411P, R479Q, R484W, R484Q, and I485F). One was a 1-bp frameshift insertion (c.1112dupG) leading to a premature stop codon (G371fsX391). This mutation is frequent in patients of French descent and has been shown to be the result of a regional founder effect.¹⁹ Four other *ACVRL1* missense mutations were also selected because they were found in patients with conflicting results with respect to their molecular diagnosis: 3 *ACVRL1* mutations (L381P, A482V, and R454W) corresponded to patients who also had a mutation in the *ENG* gene, whereas the last (R386C) was observed in a patient with 2 mutations located on the same *ACVRL1* allele.

Within these mutations, 4 (L381P, R386C, R454W, and I485F) had not been reported previously in patients with HHT2. The mutations (D179A, R374W, R374Q, L381P, R411W, R411Q, and R484W) have been described in pulmonary artery hypertension (PAH) patients.²⁰⁻²²

Double ALK1 mutants carrying both a mutation turning the receptor into a constitutively active ALK1 (ALK1ca) form (Q201D) and a mutation found in HHT2 (Q201D/A347P, Q201D/R479Q, and Q201D/R484W) were also generated by site-directed mutagenesis.

All these constructs were HA-tagged at their C-terminus. Some of the mutants were also (His)₆-tagged at their C-terminus (WT-ALK1, R479Q,

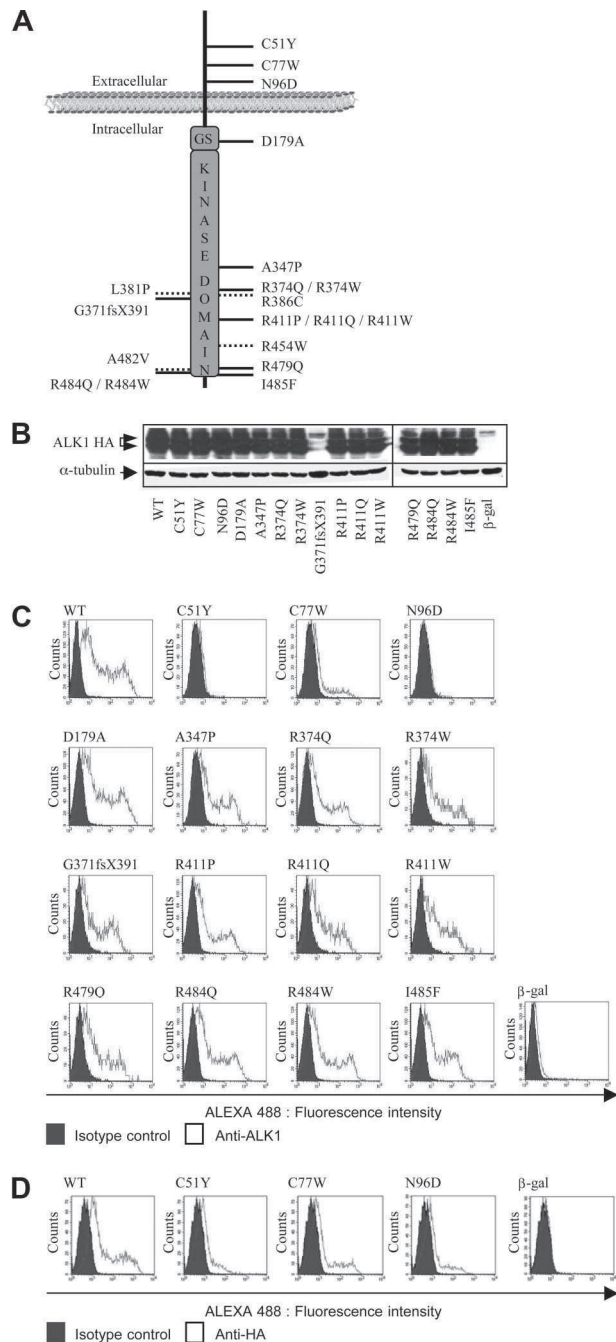


Figure 1. Expression and localization of the different ALK1 mutants. (A) The 19 different mutations are distributed on the map of the ALK1 protein. The mutations indicated with a dotted line are the conflicting mutations. (B) Protein expression of ALK1 mutants. Expression vectors encoding HA-tagged (at their C-terminus), ALK1 (WT or mutants), or β-gal (control) were transiently transfected into NIH-3T3 cells for 24 hours. Cell lysates (20 μg proteins) were resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies directed against HA and α-tubulin (as a loading control). (C-D) Flow cytometry analysis of NIH-3T3 cells transfected with expression vectors encoding HA-tagged (at their N-terminus), ALK1 (WT or mutants), or β-gal (control) for 24 hours. Nonpermeabilized transfected cells were stained for cell surface ALK1 expression (C, anti-ALK1 antibody) or (D, anti-HA antibody).

R484Q, and I485F) or HA-tagged at their N-terminus (WT-ALK1, C51Y, C77W, and N96D). A β-gal plasmid cloned in pcDNA3 was used as a control.

Reporter gene constructs

The reporter plasmid pGL3(BRE)₂-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element²³ was kindly provided by Dr P. ten Dijke

Table 1. Functional significance of *ACVRL1* mutations

Mutation location	Mutation category	Nucleotide change	Amino acid change	Location of mutation	Novel mutation	Conflicting mutation*	Expression	Localization	BMP9 binding	BMP9 response
Exon 3	Missense	c.152G → A	p.C51Y	Extracellular	—	—	Yes	Intracellular	No	No
Exon 3	Missense	c.231C → G	p.C77W	Extracellular	—	—	Yes	Partial cell surface	No	No
Exon 3	Missense	c.286A → G	p.N96D	Extracellular	—	—	Yes	Intracellular	No	No
Exon 5	Missense	c.536A → C	p.D179A	GS domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	Yes
Exon 7	Missense	c.1039G → C	p.A347P	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 8	Missense	c.1121G → A	p.R374Q	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 8	Missense	c.1120C → T	p.R374W	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 8	Frameshift	c.1112_1113dupG	p.G371fsX391	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	No	No
Exon 8	Missense	c.1142T → C	p.L381P	Kinase domain	Yes	Yes	Yes	Not tested	Not tested	No
Exon 8	Missense	c.1156C → T	p.R386C	Kinase domain	Yes	Yes	Yes	Not tested	Not tested	Yes
Exon 8	Missense	c.1232G → C	p.R411P	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 8	Missense	c.1232G → A	p.R411Q	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 8	Missense	c.1231C → T	p.R411W	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 9	Missense	c.1360C → T	p.R454W	Kinase domain	Yes	Yes	Yes	Not tested	Not tested	Yes
Exon 10	Missense	c.1436G → A	p.R479Q	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 10	Missense	c.1445C → T	p.A482V	Kinase domain	—	Yes	Yes	Not tested	Not tested	Yes
Exon 10	Missense	c.1451G → A	p.R484Q	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 10	Missense	c.1451C → T	p.R484W	Kinase domain	—	—	Yes	Cell surface	Yes	No
Exon 10	Missense	c.1453A → T	p.L485F	Kinase domain	Yes	—	Yes	Cell surface	Yes	No

*Patients with another described mutation in *ENG* or *ACVRL1*.

(Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). The pRL-TK-luc plasmid encoding renilla luciferase downstream of the thymidine kinase promoter was purchased from Promega.

DNA transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) using lipofectamine (Invitrogen) with 0.1 μ g pGL3(BRE)₂-luc, 0.02 μ g of pRL-TK-luc, and different doses of plasmids encoding WT-ALK1 or the different mutants. Four hours after transfection, cells were treated with or without recombinant BMP9 (100 pg/mL; R&D Systems) for 15 hours. Firefly and renilla luciferase activities were measured sequentially with the Dual-Luciferase reporter assay (Promega).

Immunoprecipitation and Western blot analysis

NIH-3T3 cells were transfected as described in “DNA transfection and dual luciferase activity assay” with the different ALK1 mutants. At 48 hours later, cells were serum-deprived for 1 hour and then stimulated with BMP9 (100 pg/mL) for 1 hour. Cells were then washed twice with PBS and lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer with a cocktail of protease inhibitors (P8340; Sigma-Aldrich). For immunoprecipitation, cells were lysed in 50mM phosphate buffer (pH 8), 300mM NaCl, 5mM imidazole, 0.5% (vol/vol) Triton X-100. Cell lysates were subjected to overnight immunoprecipitation with the anti-His antibody (H1029; Sigma-Aldrich), followed by adsorption to protein G Plus-Agarose (Calbiochem) for 1 hour. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10%) and analyzed by immunoblotting with anti-HA (3F10; Roche Diagnostic GmbH), anti-phosphoSmad1/5 (41D10; Cell Signaling Technology), and anti- α -tubulin (generously provided by Dr D. Job, Inserm U366, Grenoble, France) antibodies.

Flow cytometric analysis of ALK1 expression

NIH-3T3 cells were transfected as described in “DNA transfection and dual luciferase activity assay” with the different ALK1 mutants. Twenty-four hours later, cells were detached with diluted trypsin solution (0.000625%). Cells were then labeled for 1 hour at 4°C with polyclonal anti-ALK1 (AF370; R&D Systems) or anti-HA (3F10; Roche Diagnostic GmbH) antibodies or with isotype-matched control IgGs. Labeling was detected with Alexa488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). Labeled cells were analyzed by FACS using a FACScan apparatus and the CellQuest software (BD Biosciences).

[¹²⁵I]-BMP9 radioreceptor assay

BMP9 was radioiodinated using the chloramine T method.²⁴ COS-7 cells were incubated on ice for 2 hours with radiolabeled BMP9 (36 μ Ci/ μ g). After incubation, cells were washed, lysed (NaOH 0.1M), and bound radioactivity was measured in a γ -counter. Nonspecific binding, as determined on β -gal-transfected cells, was deduced from the values of total binding on ALK1-transfected cells.

Results

The ALK1 protein consists of a small extracellular domain (encoded by exons 2, 3, and part of exon 4), a short transmembrane domain (exons 4, and part of 5), and a large intracellular domain including the GS domain (from exon 5) and the serine/threonine kinase domain (exons 5-10). To investigate the effects of HHT2-related ALK1 mutations on BMP9 signaling, we first generated 15 mutants, reproducing human mutations found throughout the *ACVRL1* gene in HHT2 patients (Table 1; Figure 1A).

First, we analyzed whether these mutations affect protein expression. To this end, we transfected the ALK1 mutant constructs into NIH-3T3 cells that do not endogenously express ALK1,¹⁵ and evaluated mutant proteins by anti-HA immunoblotting. A β -gal-expressing plasmid was used as a control in all experiments. As shown in Figure 1B, all mutants, except 1 (G371fsX391), were expressed at levels comparable with that of wild-type ALK1 (WT). The mutation G371fsX391 could not be detected by Western blotting as this mutation leads to a truncated protein lacking the C-terminal HA tag. To evaluate the expression of this protein and to determine whether *ACVRL1* mutations affect ALK1 localization at the plasma membrane, we examined ALK1 cell surface expression using FACS analysis with a polyclonal anti-ALK1 antibody. No ALK1 expression was detected in the absence of ALK1 transfection in accordance with our previous work (β -gal control, Figure 1C).¹⁵ As shown in Figure 1C, ALK1 cell surface expression was detected at a similar level as WT-ALK1 in all cases, including the G371fsX391 mutant, except for cells transfected with the mutants within the extracellular domain (C51Y, C77W, and N96D). To

determine whether the ALK1 extracellular mutant protein was present at the cell surface or whether the mutations induced conformational changes that hampered epitope recognition, we HA-tagged the extracellular mutants at their N-terminus and measured cell surface expression by FACS analysis using anti-HA antibodies. As shown in Figure 1D, the C77W mutant was partially expressed at the cell surface, whereas the C51Y and N96D mutants were barely expressed at the cell surface.

We next evaluated the functional activity of these different ALK1 mutants. First, we investigated the effect of the different mutations on ALK1 activity in response to BMP9 by Western blot analysis of Smad1/5 phosphorylation. For this, 24 hours after transfection, NIH-3T3 cells were serum-deprived for 1 hour and then stimulated for 1 hour with a low dose of BMP9 (100 pg/mL) as we previously demonstrated that, at this dose, BMP9 only binds to ALK1.¹⁷ As shown in Figure 2A, the addition of BMP9 strongly induced Smad1/5 phosphorylation in the presence of WT-ALK1 but did not induce Smad phosphorylation in any mutant except D179A, which carries a mutation in the GS box. We also evaluated the activity of these mutants in response to BMP9, using the Smad1/5-responsive transcriptional reporter, pGL3(BRE)₂-luciferase.²³ The reporter assay was carried out in mutant ALK1/pGL3(BRE)₂-luciferase transfected NIH-3T3 cells stimulated with BMP9 (100 pg/mL) for 12 hours, starting 4 hours after transfection. BMP9 stimulation induced a 15-fold induction of luciferase activity in cells transfected with WT-ALK1 (Figure 2B). Again, none of these mutants responded to BMP9 stimulation, with the exception of D179A, which responded to BMP9 similarly to WT-ALK1 (16-fold induction, Figure 2B).

HHT2-related ALK1 mutations affect only 1 allele of *ACVRL1*. Potential consequences at the protein level include haploinsufficiency, with the generation of proteins totally or partially lacking receptor activity, or a dominant-negative effect, impairing the function of the normal allele. To determine whether ALK1 mutants behaved as dominant-negatives, we cotransfected equal amounts of WT-ALK1 with each individual ALK1 mutant into NIH-3T3 cells and assayed the response to BMP9. We used ALK1 plasmid amounts (0.25, 0.5, and 1 ng) that would yield cells responsiveness to BMP9 in a linear range (Figure 2C). Then, 0.5 ng of plasmid encoding WT-ALK1 together with 0.5 ng of plasmid encoding the different ALK1 mutants were transfected, after which the response to BMP9 was measured and compared with the response obtained with the WT-ALK1 (0.5 and 1 ng) alone. Addition of the different ALK1 mutants yielded a similar response to that obtained with 0.5 ng of WT-ALK1 (dotted line). This demonstrates that addition of the ALK1 mutants had no dominant inhibitory effect on the BMP9 response. Again, the mutant D179A behaved as the WT-ALK1 (Figure 2C).

Our data demonstrate that all the mutants except 1 (D179A) did not respond to BMP9, although most of them were expressed at the cell surface. We therefore determined whether these mutations could affect BMP9 binding to ALK1. To this end, transfected cells were labeled with [¹²⁵I]BMP9 for 2 hours at 4°C. We found that the 3 extracellular mutants and the frameshift mutant (G371fsX391) did not bind BMP9, whereas the other mutants bound BMP9 at a similar level to WT-ALK1 (Figure 3A).

All of the intracellular mutations that do not respond to BMP9 are located in the kinase domain. To determine the molecular mechanisms behind the loss of activity of these different intracellular mutants, we tested their intrinsic kinase activity. However, we were unable to measure an intrinsic kinase activity for ALK1 in absence of activation (data not shown). The mechanisms of ALK1

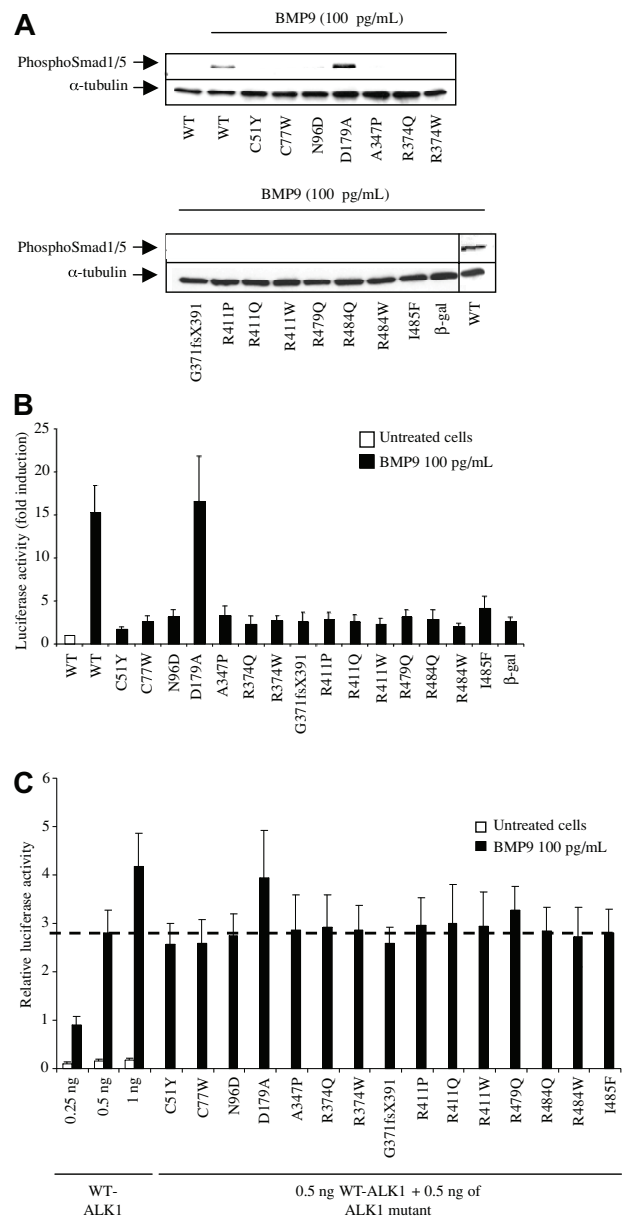


Figure 2. BMP9 response of ALK1 mutants. (A) Expression vectors encoding WT-ALK1 or the different ALK1 mutants or β -gal (control) were transiently transfected into NIH-3T3 cells. After 24 hours, cells were serum deprived for 1 hour and subsequently treated or not with BMP9 (100 pg/mL) for 1 hour. Cell lysates (20 μ g proteins) were resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with (B) NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and plasmids (0.5 ng) encoding either WT-ALK1 or the different ALK1 mutants or β -gal (control). After 4 hours, cells were treated or not with BMP9 (100 pg/mL) for 15 hours. The luciferase activities were then measured as described in "DNA transfection and dual luciferase activity assay." The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. Results are expressed as fold induction over the value obtained for each ALK1 mutant in the absence of BMP9. Data are mean \pm SD of 3 independent experiments. (C) NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and different combinations of WT and mutant ALK1: WT-ALK1 alone (0.25, 0.5, or 1 ng) or WT-ALK1 (0.5 ng) and either one of the different mutants ALK1 (0.5 ng). After 4 hours, cells were treated or not with BMP9 (100 pg/mL) for 15 hours. The luciferase activities were then measured as described in "DNA transfection and dual luciferase activity assay." The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. Data are mean \pm SD of 3 independent experiments. The dotted line represents the level of luciferase activity obtained with 0.5 ng of WT-ALK1 stimulated with BMP9.

activation have not been studied in detail and are generally extrapolated from what is known about TGF- β signaling through

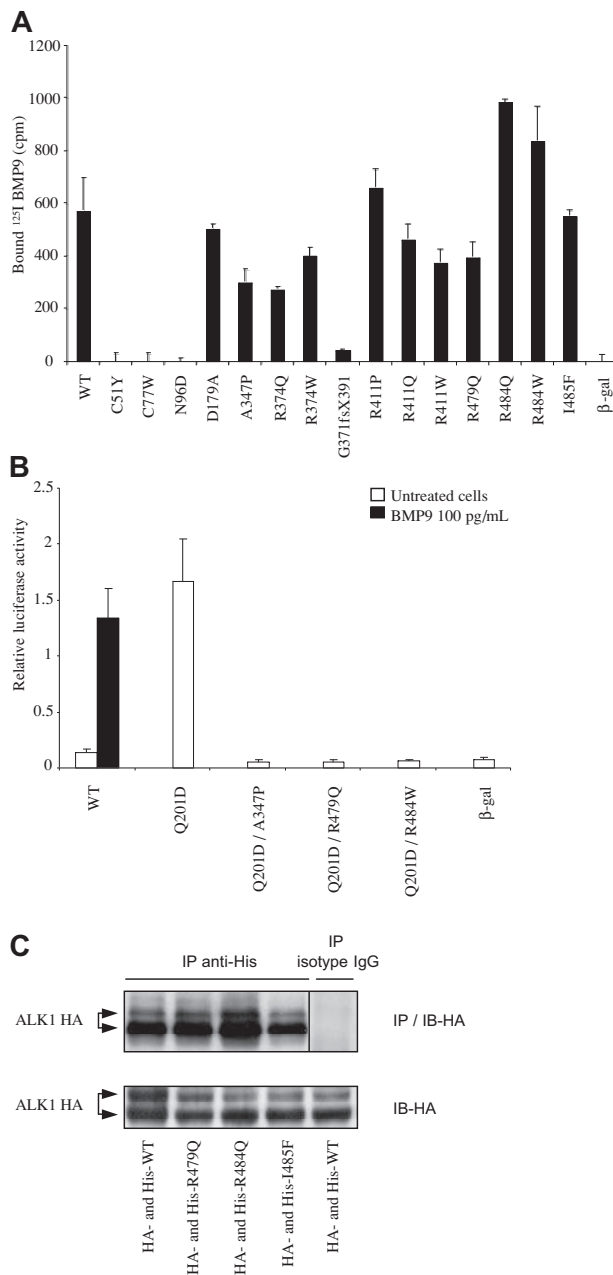


Figure 3. BMP9 binding to the different ALK1 mutants and functional analysis of the NANDOR ALK1 mutants. (A) β -gal, WT-ALK1, or the different ALK1 mutants were transiently transfected in COS-7 cells for 48 hours. Cells were then incubated with [¹²⁵I]BMP9 for 2 hours at 4°C. Cells were then washed, lysed, and the bound radioactivity was counted as described in “¹²⁵I-BMP9 radioreceptor assay.” Data are mean \pm SD from 1 representative experiment of 3. (B) NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and WT-ALK1, or the constitutively active ALK1 mutant (ALK1ca, Q201D) or the different ALK1 double mutants (0.5 ng) or β -gal (control). After 4 hours, cells were treated or not with BMP9 (100 pg/mL) for 15 hours. The luciferase activities were then measured as described in “DNA transfection and dual luciferase activity assay.” The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. Data are mean \pm SD of 3 independent experiments. (C) COS-7 cells were cotransfected with expression vectors encoding an HA-tagged and a His-tagged version of either WT-ALK1 or ALK1 mutants for 24 hours. Cell lysates (1-mg proteins) were subjected to immunoprecipitation with anti-His. These lysates were then resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against HA (IP/IB-HA). In parallel, cell lysates (20 μ g proteins) were also resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against HA (IB-HA).

ALK5. TGF- β initially binds to T β RII, resulting in type I receptor (ALK5) recruitment, and its subsequent phosphorylation by the type II receptor. This transactivation step then leads to activation of

the type I receptor. Several ALK5 mutants have been described that are mutated either in the kinase domain (G322D and G261E)²⁵ or in a region, referred to as the NANDOR box (nonactivating non-down-regulating), present at the C-terminal tail of ALK5.²⁶ ALK5 NANDOR mutants have an intact kinase activity but are not transactivated by the type II receptor in response to ligand binding. Interestingly, 4 HHT2-derived *ACVRL1* mutations studied here were located in the NANDOR box of the ALK1 protein (R479Q, R484Q, R484W, and I485F). To determine whether these mutations might be involved in the transactivation step, we attempted to evaluate the result of bypassing RII transactivation. For this, we used a constitutively active ALK1 mutant (ALK1ca, Q201D) that is activated in a ligand-independent manner,²⁷ in which we introduced additional mutations. We first tested a double mutant carrying both the Q201D and the A347P mutations. The A347P mutation is located within the catalytic domain and is adjacent to the amino acid that binds Mg²⁺, an essential cofactor of adenosine triphosphate (ATP) binding. Indeed, this mutation completely abolished the BRE response of ALK1ca (Figure 3B). Surprisingly, double mutants carrying the Q201D mutation and a mutation in the NANDOR box (R479Q and R484W) were also inactive (Figure 3B). Another step that has been shown to be crucial in ALK5 signaling is the formation of homodimeric complexes between 2 type I receptors.^{25,28,29} To test whether ALK1 NANDOR mutants form homodimers, we performed coimmunoprecipitation studies on cells cotransfected with 2 ALK1 constructs, each carrying a different epitope tag (HA or (His)6). Lysates from cells expressing these differentially tagged receptors were immunoprecipitated with anti-His antibodies. The immunoprecipitates were then subjected to SDS-PAGE and Western blotting using anti-HA antibodies. The results show that the NANDOR mutants tested (R479Q, R484Q, and I485F) coimmunoprecipitate and therefore form homodimers (Figure 3C).

Our data suggested that the study of the BMP9 responses in cells expressing the different ALK1 mutants could be used to assess the functional consequences of missense mutations in *ACVRL1*. This could be particularly useful in the interpretation of the pathologic significance of novel missense mutations of *ACVRL1*, especially in complex situations where several mutations (in *ACVRL1* or in *ACVRL1* and *ENG*) are found in the same patient. To test this hypothesis, we analyzed 4 *ACVRL1* missense mutations (L381P, R386C, R454W, and A482V) identified in HHT patients carrying another mutation in either *ACVRL1* or *ENG* (Service de Génétique Moléculaire et Clinique, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France; Figure 1A dotted lines). We found that these 4 mutant proteins were all expressed (Figure 4A). We next evaluated the functional activity of these different ALK1 mutants in response to BMP9. Three ALK1 mutants responded to BMP9 (R386C, R454W, and A482V) and 1 mutant, L381P, did not respond to BMP9 stimulation either measured in the BRE assay or by Smad1/5 phosphorylation (Figure 4B-C). Functional testing strongly suggested that R386C, R454W, and A482V mutations are rare polymorphisms, whereas the L381P mutation leads to a nonfunctional protein.

Discussion

In the present manuscript, we studied the functional consequences of a series of *ACVRL1* mutations (19) found in HHT2 patients affecting different domains of the ALK1 protein. This is the largest

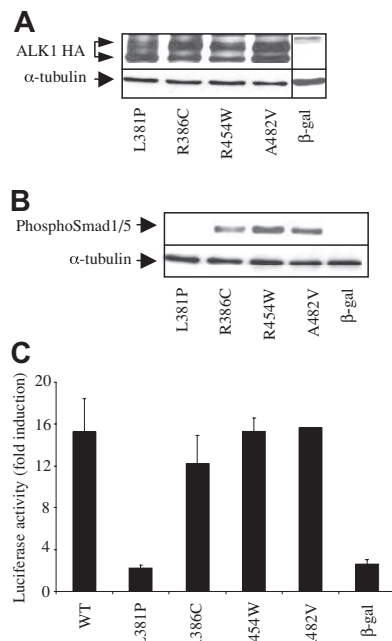


Figure 4. Functional analysis of the BMP9 response of conflicting ALK1 mutants. (A) Protein expression of WT-ALK1 or ALK1 mutants. Expression vectors encoding HA-tagged WT-ALK1 or ALK1 mutants or β -gal (control) were transiently transfected in NIH-3T3 cells for 24 hours. Cell lysates (20 μ g proteins) were resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against HA and α -tubulin (as a loading control). (B) Expression vectors encoding WT-ALK1 or the different ALK1 mutants or β -gal (control) were transiently transfected into NIH-3T3 cells. After 24 hours, cells were serum deprived for 1 hour and subsequently treated with BMP9 (100 pg/mL) for 1 hour. Cell lysates (20 μ g proteins) were resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphoSmad1/5 or against α -tubulin (as a loading control). (C) NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and plasmids (0.5 ng) encoding either WT-ALK1 or the different ALK1 mutants or β -gal (control). After 4 hours, cells were treated (■) with BMP9 (100 pg/mL) for 15 hours. The luciferase activities were then measured as described in "DNA transfection and dual luciferase activity assay." The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. Results are expressed as fold induction over the value obtained for each ALK1 mutant in the absence of BMP9. Data are mean \pm SD of 3 independent experiments.

study of this type and the first to analyze ALK1 mutants in both the extracellular and intracellular domains. This is also the first study to evaluate the BMP9 response of ALK1 as opposed to the TGF- β response analyzed in previous studies.^{30,31}

We have analyzed the BMP9-response of 19 ALK1 mutations described in HHT2 patients: 15 had already been published, and 4 were novel mutations. Of the 19 studied mutations, we identified 4 (D179A, R386C, R454W, and A482V) that were probably not causing HHT disease but instead represent rare polymorphisms. The first mutation (D179A) has been described in the intracellular GS region, which is phosphorylated by the type II receptor. This is the only mutation reported in this region.²¹ We found that this mutant was expressed at the cell surface in accordance with previously published data,²¹ that it could bind BMP9, and that it induces a similar phosphoSmad1/5 response after binding BMP9 to that of WT-ALK1. This patient died, and no parent or surviving relatives were available for further studies. Our data suggest that this mutation is very unlikely to cause the disease. The second mutation, A482V, was studied by 3 different groups. It was first identified in a patient with a gonadotroph tumor; however, the patient and its relatives showed no symptoms of HHT.³² This mutation was then described by Lesca et al in an HHT patient.³³ Finally, Letteboer et al also described this mutation; however, it was found with another *ACVRL1* (P424L) or *ENG* (W261R)

mutation.³⁴ In line with this result, we reanalyzed DNA from this patient and found a mutation in *ENG* c.1121_1124delAAGA, which leads to a truncated protein, and so, is very probably the cause of the disease. We can therefore conclude that the mutation A482V is probably a rare polymorphism. The patient carrying the mutation R386C was later found to carry also the mutation R411W in *ACVRL1*, which has been analyzed in this study and demonstrated to result in a defective BMP9 response. The patient carrying the mutation R454W had an additional mutation in *ENG* leading to a truncated protein (G296fsX), which is probably the cause of the disease. In this study, we also identified 2 novel *ACVRL1* mutations in HHT2 patients (L381P and I485F) that are pathogenic. The mutation L381P has already been described in patients with PAH.²⁰ The HHT2 patient, carrying the mutation L381P, is also carrying a mutation in *ENG* (V504M). Because this *ENG* mutation is a missense mutation, it is of major importance for genetic counseling to establish whether it has a pathogenic consequence. Taken together, our data clearly demonstrate that we can use the BMP9 response as a useful diagnostic tool for geneticists confronted with novel or conflicting *ACVRL1* mutations both in HHT and PAH.

We have studied 3 extracellular *ACVRL1* mutations (C51Y, N96D, and C77W) that were first described by Klaus et al.³⁵ We found that these 3 mutants were expressed, but that they did not reach the cell surface properly, did not bind BMP9, and did not respond to BMP9. Two corresponded to cysteine substitutions (C51Y and C77W); the mutant C51Y disrupts the first disulfide bridge, whereas the mutant C77W disrupts the fourth disulfide bridge. The last mutation corresponded to an asparagine mutated into an aspartic acid (N96D), which adds a negative charge to the protein. This asparagine is conserved in all ALKs, which might indicate that it is of functional importance. None of these amino acids was shown to be directly involved in BMP2/ALK3 binding.³⁶

The other mutations were intracellular mutations and involved the large kinase domain. All were expressed at the cell surface, and all bound BMP9, except c.1112dupG (G371fsX391) mutation, which encodes a truncated protein. None of the mutants was functional in response to BMP9. The ALK1 intracellular structure has not been determined yet, but the amino acid sequence alignment of ALK1 and ALK5 reveals an overall similarity of ALK1 with ALK5, allowing us to generate a structural model of the cytoplasmic domain of ALK1 by computer modeling based on the homologous structure of activated ALK5³⁷ (Figure 5). The different missense mutations were analyzed for their position in the kinase domain. The A347P mutation is located within the catalytic domain and is adjacent to the amino acid that binds Mg^{2+} , an essential cofactor of ATP binding. Therefore, a change from alanine into proline would clearly inhibit ATP binding. Arginine-411 has been described as mutated to a glutamine, a tryptophan, or a proline residue in HHT2 patients; therefore, we chose to analyze these 3 mutations to determine whether these mutants would differently impair ALK1 activity. We found that none of these mutants was functional in response to BMP9, demonstrating that this amino acid is essential for ALK1 activity and that substitutions with Q, W, or P have similar consequences. The expression of the mutant R411Q was already studied by 2 other groups, and our expression data are in accordance with the work of Gu et al³⁰ but not Harrison et al²¹ who found no membranous expression of the R411Q mutant. This last study was performed using GFP-ALK1 proteins, which might lead to mislocalization of the protein. In contrast to Gu et al,³⁰ who found that R411Q retained TGF- β -induced BRE activity, suggesting that reduced activity might be sufficient to cause the disease

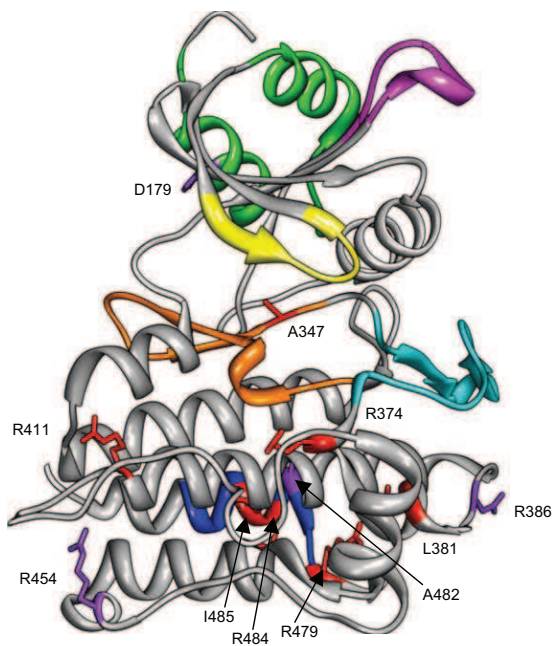


Figure 5. Structural model of ALK1 cytoplasmic domain. A structural model of ALK1 intracellular domain was generated by homology modeling to the corresponding domain of ALK5 deduced from its crystal structure.^{37,38} The different domains of the proteins are indicated in different colors: GS box in green (amino acids 172-201), phosphate binding domain in yellow (amino acids 208-214), Smad binding loop (L45) in magenta (amino acids 263-270), catalytic loop in orange (amino acids 328-348), activation domain in cyan (amino acids 351-375), and NANDOR box in blue (amino acids 479-489). The positions of the 18 missense mutations, overlaid on the modeled structure, are indicated in red for the pathogenic mutations and in purple for the rare polymorphisms.

phenotype, we could not find any residual activity in response to BMP9. We also studied R374W, which is a rather common mutation, shared by patients from different countries and R374Q. We found that these 2 mutants were expressed at the cell surface. R374W had already been shown to be expressed at the cell surface by Gu et al³⁰ and Fernandez et al,³⁹ whereas R374Q was studied by the group of Harrison et al²¹ who found no membrane expression. As discussed earlier, GFP-ALK1 proteins were used in those studies, which might lead to mislocalization. Further, we demonstrated that none respond to BMP9. R374W had already been shown to be inactive in response to TGF- β by Gu et al³⁰ and Fernandez et al.³⁹ Amino acid 374 is located within the subdomain VIII, which plays an important role in substrate recognition by providing a pocket to accommodate hydrophobic residues. The other intracellular mutations studied here were localized at the C-terminal tail of ALK1, located within the highly conserved –COOH domain, which contains a NANDOR box.²⁶ In ALK5, this NANDOR box appears to be necessary for the regulation of TGF- β signaling through ALK5. This box of 11 amino acids shows 100% identity between the different type I receptors of the TGF- β family. Mutations in this box (R486W and R486Q) have been described in ALK6 causing brachydactyly type A2,^{40,41} and in ALK5 (R487Q/W/P and R478Q) causing Loeys-Dietz syndrome.⁴²⁻⁴⁴ Four *ACVRL1* mutations within this box were analyzed: R479Q, R484Q, R484W, and I485F. Interestingly, the R484W mutation has been identified in a patient with HHT and PAH.²² I485F, which has not been reported earlier, was found in a HHT2 patient who underwent liver transplantation because of severe hepatic damage. These mutants were expressed at the cell surface and could bind BMP9, but they had no functional activity in response to BMP9. It was shown for ALK5 that this box is necessary for type I receptor phosphorylation

by the type II receptor in response to ligand binding and that mutation within this box does not modify its kinase activity.^{25,26} In accordance with these data, it was found that the mutation R486W in ALK6 had a normal kinase activity while it inhibited chondrogenic differentiation.⁴¹ Because we were unable to perform successful *in vitro* ALK1 kinase assays, probably because of its very low intrinsic kinase activity, as previously described,⁴⁵ we attempted to discriminate transactivation mutants from kinase-dead mutants by bypassing the transactivation step using the constitutively active ALK1ca (Q201D) mutant that has been shown to be ligand-independent.²⁷ We found that mutations in the NANDOR box completely abolished ALK1ca-induced response (Figure 3B). This was unexpected as NANDOR box mutants of ALK5 have been shown to transcomplement kinase-dead mutants of ALK5.²⁶ Another important step that has been shown to be important in ALK5 signaling is the formation of homodimeric complexes between 2 type I receptors.^{25,28,29} We therefore wondered if a similar mechanism might occur for ALK1 and if some of the ALK1 NANDOR mutants might be nonfunctional because of their inability to homodimerize. To test this hypothesis, we performed coimmunoprecipitation studies on cells cotransfected with 2 ALK1 forms, each carrying a different epitope tag. The results show that the NANDOR mutants could coimmunoprecipitate (Figure 3C), indicating that they form homodimers. Our conclusion is that mutations within the ALK1 NANDOR box result in kinase-dead ALK1 receptor, suggesting that ALK1 does not behave in a similar fashion as ALK5.

TGF- β signaling requires 2 type I receptors complexed to 2 type II receptors. HHT2 patients have only 1 allele mutated. To mimic this heterozygosity, we transfected WT-ALK1 constructs with the different ALK1 mutants at an equal ratio and compared their level of activation with that of WT-ALK1 alone. We found that ALK1 mutants did not decrease the WT-ALK1 response, indicating that these mutants do not behave as dominant-negative receptors. This conclusion differs from that of Fernandez et al³⁹ and Gu et al³⁰ who found that certain ALK1 mutants inhibited the function of the WT allele. However, in their studies, they used TGF- β 1 as an inducer, which requires the presence of ALK5 to activate the BRE promoter.⁴⁵ Therefore, they did not test WT-ALK1/mutALK1 heterozygotes but, rather, ALK5/WT-ALK1 and ALK5/mutALK1. ALK5 has been shown recently to directly phosphorylate Smad1/5 independently of ALK1,^{46,47} and this is why some residual activity may still be observed with some ALK1 mutants.^{30,39} In the present study, we demonstrated that the identification of BMP9 as the specific and physiologic ligand for ALK1 now allows specific evaluation of the functional significance of *ACVRL1* mutations.

In conclusion, this work demonstrates that *ACVRL1* mutations lead to functional haploinsufficiency of the BMP9 response. This indicates that loss of only half of the ALK1 response is sufficient to lead to disease development. This suggests that one could envision therapies directed either at increasing ALK1 levels or increasing the level of its specific ligand, BMP9, which is known to circulate in blood.¹⁵ We also demonstrated that analysis of the BMP9 response could discriminate pathogenic (L381P and I485F) from polymorphic (D179A, R386C, and R454W) *ACVRL1* mutations. We therefore propose that analysis of the BMP9 response can be used as a diagnostic tool by geneticists confronted with novel or conflicting *ACVRL1* mutations.

Acknowledgments

The authors thank Dr J. LaMarre (University of Guelph, ON) for his review of the manuscript.

This work was supported by Inserm, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Association pour la Recherche sur le Cancer, Projet Hospitalier de Recherche Clinique, Hospices Civils de Lyon (grant 27), and Association des Malades de Rendu-Osler. N.R. was supported by the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CFR grant).

Authorship

Contribution: N.R., M.B., C.M., and S.B. performed research; G.L. and S.G. contributed to the choice of the *ACVRL1* mutations and the discussion; R.P. helped in the modeling of ALK1; and J.-J.F. and S.B. designed research and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Sabine Bailly, U878, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France; e-mail: sbailly@cea.fr.

References

- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994;8(4):345-351.
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*. 1996;13(2):189-195.
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in *MADH4* (*SMAD4*). *Lancet*. 2004;363(9412):852-859.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, et al. A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A*. 2006;140(20):2155-2162.
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. A new locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*. 2005;42(7):577-582.
- Lesca G, Burnichon N, Raux G, et al. Distribution of *ENG* and *ACVRL1* (*ALK1*) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat*. 2006;27(6):598.
- Fontalba A, Fernandez LA, Garcia-Alegria E, et al. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *BMC Med Genet*. 2008;9:75.
- Cymerman U, Vera S, Karabegovic A, Abdalla S, Letarte M. Characterization of 17 novel endoglin mutations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat*. 2003;21(5):482-492.
- Shoukier M, Teske U, Weise A, Engel W, Argyriou L. Characterization of five novel large deletions causing hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet*. 2008;73(4):320-330.
- Lesca G, Olivieri C, Burnichon N, et al. Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network. *Genet Med*. 2007;9(1):14-22.
- Chan NL, Bourdeau A, Vera S, et al. Umbilical vein and placental vessels from newborns with hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1 genotype are normal despite reduced expression of endoglin. *Placenta*. 2004;25(2):208-217.
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, et al. Blood outgrowth endothelial cells from hereditary haemorrhagic telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res*. 2005;68(2):235-248.
- Pece-Barbara N, Cymerman U, Vera S, Marchuk DA, Letarte M. Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(12):2171-2181.
- Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, et al. Analysis of *ALK-1* and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet*. 2000;9(8):1227-1237.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (*ALK1*) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109(5):1953-1961.
- Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via *ALK1* and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007;120(6):964-972.
- David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922.
- Bailly S. HHT is not a TGFβ disease. *Blood*. 2008;111(2):478.
- Lesca G, Genin E, Blachier C, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: evidence for regional founder effects of *ACVRL1* mutations in French and Italian patients. *Eur J Hum Genet*. 2008;16(6):742-749.
- Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, et al. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (*ALK1*) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (*BMPRII*) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2008;72(1):127-133.
- Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, et al. Molecular and functional analysis identifies *ALK-1* as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003;40(12):865-871.
- Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001;345(5):325-334.
- Korchynskyi O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the *Id1* promoter. *J Biol Chem*. 2002;277(7):4883-4891.
- Frolik CA, Roller PP, Cone JL, Dart LL, Smith DM, Sporn MB. Inhibition of transforming growth factor-induced cell growth in soft agar by oxidized polyamines. *Arch Biochem Biophys*. 1984;230(1):93-102.
- Weis-Garcia F, Massague J. Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *EMBO J*. 1996;15(2):276-289.
- Garamszegi N, Dore JJ Jr, Penheiter SG, Edens M, Yao D, Leof EB. Transforming growth factor beta receptor signaling and endocytosis are linked through a COOH terminal activation motif in the type I receptor. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2881-2893.
- Fuji M, Takeda K, Imamura T, et al. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3801-3813.
- Luo K, Lodish HF. Signaling by chimeric erythropoietin-TGF-beta receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J*. 1996;15(17):4485-4496.
- Gilboa L, Wells RG, Lodish HF, Henis YI. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol*. 1998;140(4):767-777.
- Gu Y, Jin P, Zhang L, et al. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-β receptor *ALK1* reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood*. 2006;107(5):1951-1954.
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabeu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res*. 2006;4(1):66-78.
- D'Abronzio FH, Swearingen B, Klibanski A, Alexander JM. Mutational analysis of activin/transforming growth factor-beta type I and type II receptor kinases in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(5):1716-1721.
- Lesca G, Plauchu H, Coulet F, et al. Molecular screening of *ALK1/ACVRL1* and *ENG* genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat*. 2004;23(4):289-299.
- Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: *ENG* and *ALK-1* mutations in Dutch patients. *Hum Genet*. 2005;116(1):8-16.
- Klaus DJ, Gallione CJ, Anthony K, et al. Novel missense and frameshift mutations in the activin receptor-like kinase-1 gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia: mutations in brief no. 164. *Hum Mutat*. 1998;12(2):137.
- Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*. 2000;7(6):492-496.
- Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massague J. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell*. 2001;8(3):671-682.
- Huse M, Chen YG, Massague J, Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell*. 1999;96(3):425-436.
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, et al. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and *ALK1*. *Hum Mutat*. 2006;27(3):295.
- Lehmann K, Seemann P, Stricker S, et al. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12277-12282.
- Lehmann K, Seemann P, Boergemann J, et al. A novel R486Q mutation in *BMPRI1B* resulting in

- either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(12):1248-1254.
42. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275-281.
43. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med.* 2006;355(8):788-798.
44. Matyas G, Arnold E, Carrel T, et al. Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan syndrome-related disorders. *Hum Mutat.* 2006;27(8):760-769.
45. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, et al. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell.* 2003;12(4):817-828.
46. Liu IM, Schilling SH, Knouse KA, Choy L, Derynck R, Wang XF. TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *EMBO J.* 2009;28(2):88-98.
47. Wrighton KH, Lin X, Yu PB, Feng XH. Transforming growth factor β can stimulate Smad1 phosphorylation independently of bone morphogenic protein receptors. *J Biol Chem.* 2009;284(15):9755-9763.

ALK1	-----ECWYPNPSARLTALRIKKTILQKISNSPEKPKVIQ
ALK2	-----ECWYQNPSARLTALRIKKTITKIDNSLDKLTDC
ALK3	LKLMSECWAHNPASRLTALRIKKTILAKMVESQDVKI---
ALK4	MR---ECWYANGAARLTALRIKKTISQLSVQEDVKI---
ALK5	-R---ECWYANGAARLTALRIKKTISQLSQQEGIKM---
ALK6	-KLMTECWAHNPASRLTALRVKKTILAKMSESQDIKL---
ALK7	MR---ECWYANGAARLTALRIKKTISQLCVKEDCKA---

Figure 69 : Comparaison des séquences C-terminale des différents récepteurs de type 1.
 La boîte NANDOR est encadrée en vert. Elle est très conservée, les différences étant entre deux acides aminés chimiquement très proches.

Discussion

Notre étude a montré que les mutants d'ALK1 impliqués dans HHT-2 ne peuvent pas phosphoryler Smad1/5/8 en réponse à BMP9. Cette découverte a permis de mettre au point un test diagnostique qui permet de discriminer les polymorphismes des mutations pathogènes. Le test d'activité biologique d'ALK1 en réponse à BMP9 utilisant le plasmide BRE-luciférase est actuellement utilisé en routine dans le Service de génétique moléculaire et clinique de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon. Ce test permet au généticien de pouvoir diagnostiquer les porteurs de nouvelles mutations d'*ACVRL1* dont la pathogénicité est inconnue ou de faire du conseil génétique aux familles porteuses de plusieurs mutations d'*ACVRL1* et/ou d'*Endogline*. La pénétrance de la maladie étant tardive et les degrés de sévérité des symptômes très variables d'un patient à un autre, il apparaît très utile au médecin de pouvoir identifier la pathogénicité d'une mutation tôt dans la vie du patient afin de pouvoir mettre en place si nécessaire un suivi pour ce patient. Notre étude n'a porté que sur les conséquences des mutations d'*ACVRL1* sur la voie Smad1/5/8. Or, ALK1 est capable d'activer d'autres voies dont les voies JNK et Erk (David L. 2007b). Nous ne pouvons donc pas complètement exclure que des mutants puissent être actifs pour la voie Smad et inactifs pour les autres voies. De tels mutants seraient alors détectés comme des polymorphismes rares par notre test diagnostique, alors qu'ils pourraient entraîner une pathologie (risque de faux négatifs).

Les cotransfections avec un allèle muté et l'allèle sauvage d'ALK1 a permis de recréer des cellules hétérozygotes, modélisant ainsi des cellules de patient. Ces cellules ont perdu la moitié de leur capacité à phosphoryler Smad1/5/8 en réponse à BMP9, comparées aux cellules ayant reçu l'allèle sauvage uniquement. Ce résultat nous permet de proposer l'haploinsuffisance fonctionnelle comme modèle moléculaire de HHT-2.

Les mutants d'ALK1 liés à HHT-2 ont clairement perdu leur capacité à activer la voie Smad1/5/8. Les causes de la perte d'activité sont variables en fonction de la zone mutée.

Les mutants du domaine extracellulaire sont peu, voire pas détectés à la membrane et ne lient pas BMP9. Cette perte de localisation membranaire associée à une perte de la liaison du ligand entraîne une inactivité totale de ces mutants.

Les mutants ponctuels du domaine kinase (A347P à R411W) sont bien présents à la membrane, lient le ligand mais ne transduisent pas de signalisation. Ces mutations entraînent

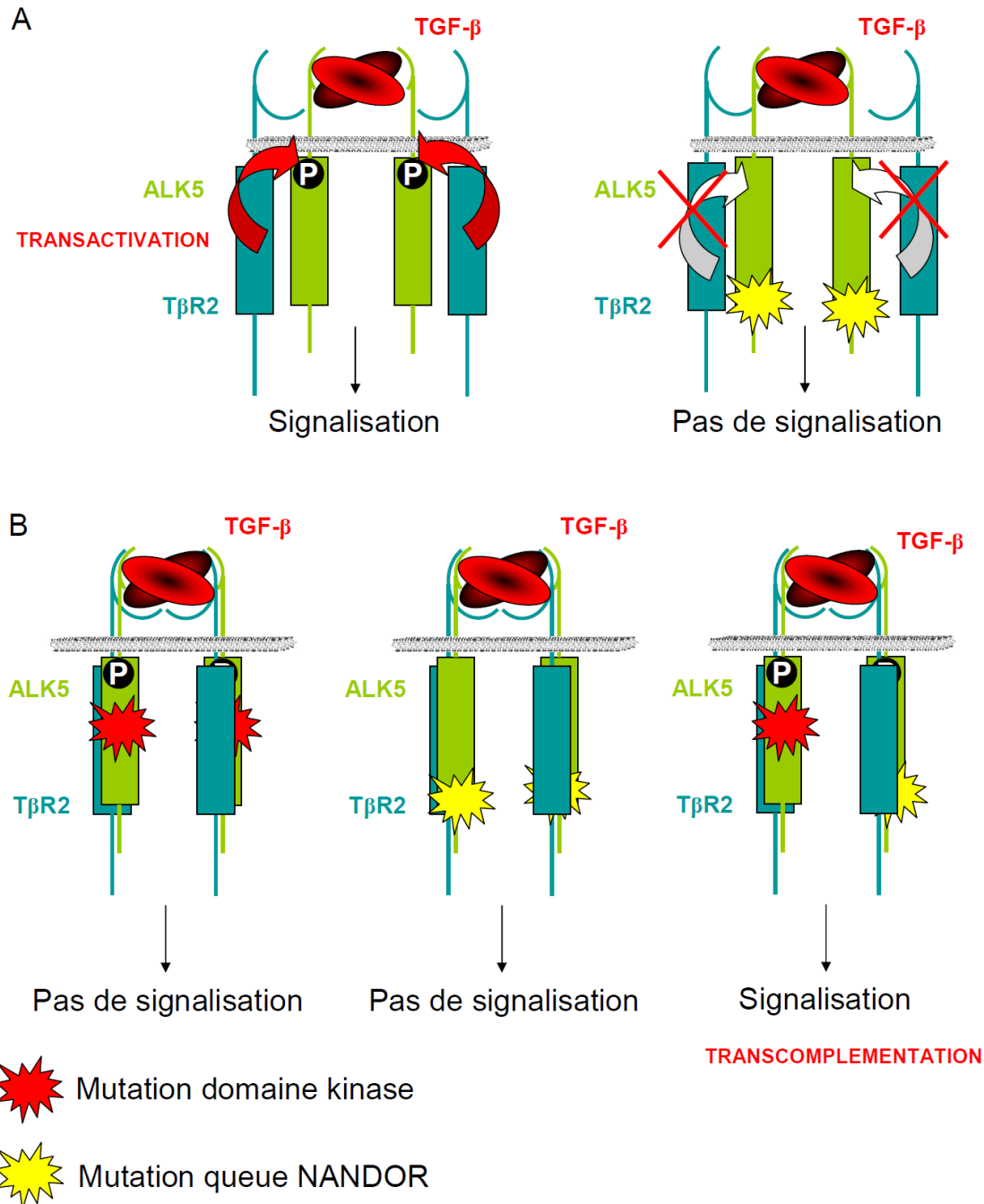


Figure 70 : Transactivation et transcomplémentation d'ALK5.

A : TβR2 phosphoryle ALK5 en réponse à TGF-β. Cette étape dans l'activation d'ALK5 est appelée transactivation. Les mutants NANDOR (mutation en jaune) ne peuvent pas être transactivés.

B : Les mutants kinases d'ALK5 (mutations en rouge) sont inactifs en réponse à TGF-β, ainsi que les mutants NANDOR. Cependant, les complexes composés d'un ALK5 muté dans le domaine kinase (mutation rouge) et d'un ALK5 muté dans la queue NANDOR (mutation jaune) peuvent transduire un signal. C'est la transcomplémentation.

une inactivation du domaine kinase, soit par défaut de fixation de l'ATP (A347P), soit par défaut de liaison du substrat (R374W).

Les mutants de la boîte NANDOR (R479Q, R484Q, R484W et I485F) sont eux aussi inactifs en réponse à BMP9. Leur étude nous a permis de mieux comprendre la signalisation d'ALK1 et je vais détailler dans cette discussion les conséquences de mon travail sur nos connaissances de la signalisation d'ALK1.

Le modèle de signalisation des récepteurs de la famille TGF- β comporte une étape appelée transactivation, c'est-à-dire la phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2 (figure 70A). Le complexe de signalisation comporte deux hétérodimères, composés d'un récepteur de type 1 et d'un récepteur de type 2.

La boîte NANDOR est un domaine de 11 acides aminés très conservé entre les différents récepteurs de type 1 (figure 69). Ce domaine n'a été étudié que dans une seule étude en presque 20 ans d'étude de la signalisation TGF- β (Garamszegi N. 2001). Cette étude menée sur ALK5 concluait à l'implication de la boîte NANDOR dans la transactivation, les mutants NANDOR d'ALK5 n'étant pas phosphorylés par T β R2 (Garamszegi N. 2001).

Afin de tester si les mutants NANDOR d'ALK1 sont des mutants de transactivation, nous avons d'abord étudié la phosphorylation des mutants NANDOR d'ALK1 par BMPR2 avec une stimulation par BMP9 après incorporation de P³². Malheureusement, nous n'avons pas observé de phosphorylation d'ALK1 WT, suite à des difficultés techniques. Nous avons donc essayé une autre stratégie. La mutation Q201D rend le récepteur ALK1 constitutivement actif, c'est-à-dire qu'il ne nécessite ni la présence d'un récepteur de type 2, ni la présence du ligand (Wieser R. 1995) (Fujii M. 1999). Nous avons alors réalisé des doubles mutants Q201D/mutation NANDOR. Ces doubles mutants sont tous inactifs (fig. 3B de l'article). Si les mutants NANDOR étaient des mutants de transactivation, les doubles mutants auraient dû être actifs.

Une caractéristique des mutants de transactivation sur ALK5 est la possibilité de les transcomplémenter. En effet, deux mutants d'ALK5 (G322D et G261E) ont été définis comme des mutants de transactivation puisque T β R2 ne les phosphoryle pas (Weis-Garcia F. 1996). Ils sont aussi inactifs en réponse à TGF- β . Cependant, une cotransfection de ces mutants avec un mutant ayant une kinase inactive (K232R) aboutit à une restitution de l'activité, T β R2 pouvant à nouveau phosphoryler le mutant de transactivation (figure 70B). Cette restitution de l'activité de signalisation d'un mutant de transactivation par un mutant de kinase inactive est appelée transcomplémentation. Cependant, aucune donnée ne permet d'expliquer la

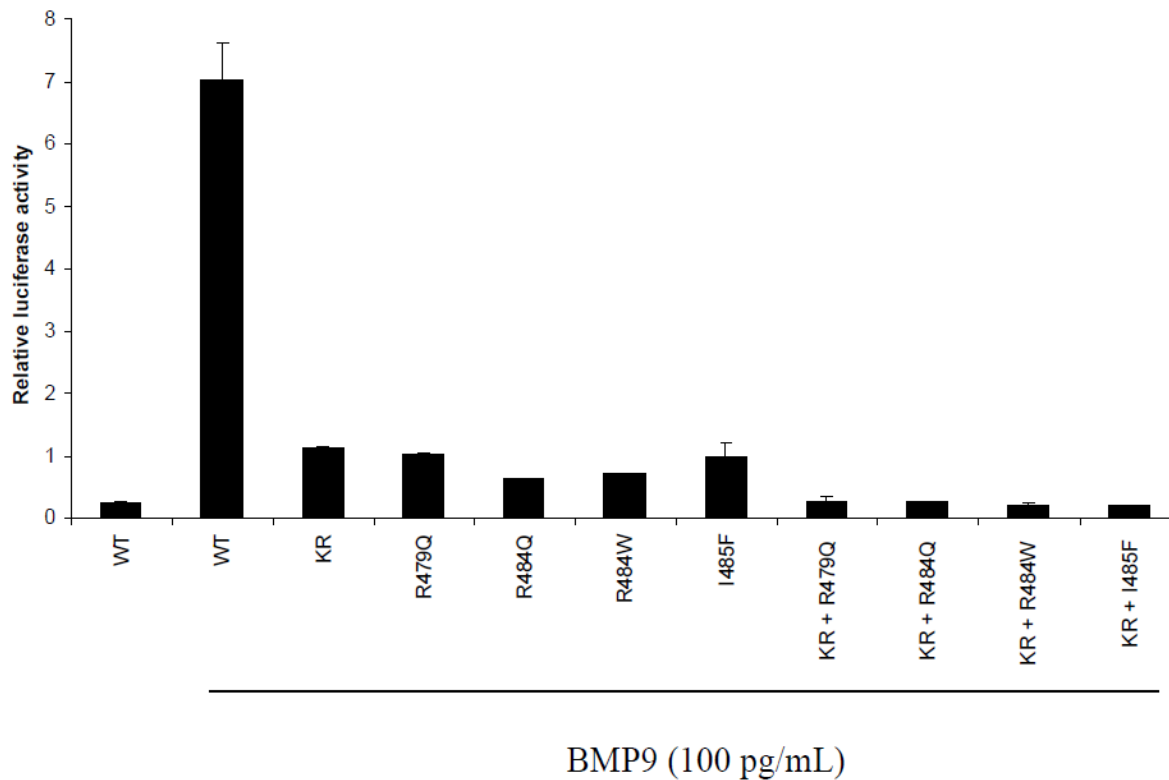


Figure 71 : Les mutants NANDOR ne sont pas transcomplémentés par des mutants kinases.

Des cellules NIH-3T3 ont été transfectées avec BRE-luciférase et ALK1 WT ou ALK1 KR (mutant du domaine kinase) et/ou ALK1 NANDOR et stimulées avec BMP9 (100 pg/mL) pendant 15 h. L'activité luciférase mesurée n'est pas augmentée dans les cotransfections ALK1 KR/ALK1 NANDOR.

phosphorylation des mutants de transactivation par T β R2 lorsqu'un mutant kinase est présent. Il a été décrit que les mutants de la boîte NANDOR d'ALK5 peuvent être transcomplémentés (Garamszegi N. 2001). J'ai donc voulu étudié la transcomplémentation des mutants NANDOR d'ALK1 avec un mutant kinase (K229R). Pour cela j'ai cotransfecté un mutant kinase avec un mutant de la boîte NANDOR. Comme vous pouvez le voir sur la [figure 71](#), aucune transcomplémentation n'a été détectée. Deux hypothèses sont alors possibles. 1) La première consiste à penser que les mutants NANDOR d'ALK1 n'ont pas la même conséquence fonctionnelle que les mutants NANDOR d'ALK5. 2) La seconde est que les mutants NANDOR d'ALK5 sont en fait des mutants kinases, les études de transcomplémentation et de transactivation ayant été réalisées au début de l'étude de la signalisation TGF- β avec des méthodes pouvant conduire à des artéfacts.

Une étude récente utilise du TGF- β dont un des deux monomères ne peut plus lier les récepteurs suite à des mutations (Huang T. 2011). Le dimère qui en résulte ne se lie que sur un récepteur ALK5 et un récepteur T β R2. La transduction du signal est maintenue dans ce type de conformation. Ces résultats prouvent que dans l'hétérotétramère comprenant deux dimères ALK5/T β R2, les deux dimères fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. La transcomplémentation ne semble pas compatible avec cette étude.

Il est à noter aussi que si la transcomplémentation était réelle, les mutants d'ALK5 qui sont dans la boîte NANDOR ne devraient pas se retrouver sur des patients atteints du syndrome de Loeys-Dietz. En effet, les patients étant hétérozygotes, l'allèle sauvage transcomplémenterait alors parfaitement l'allèle mutée rendant la voie du TGF- β quasiment totalement active (dimères WT/WT – MUT/WT – WT/MUT actifs et seuls les dimères MUT/MUT inactifs). Or, quatre mutations sont décrites dans la boîte NANDOR d'ALK5 et entraînent ce syndrome : R487Q/W/P et R478Q (Loeys B. L. 2005) (Loeys B. L. 2006) (Matyas G. 2006). Je remets donc clairement en cause la possibilité qu'un allèle sauvage puisse transcomplémenter un mutant NANDOR. D'ailleurs, l'analyse de cotransfection ALK1 WT/ALK1 NANDOR dans l'article (fig. 2C de l'article) ne montre pas une activité supérieure aux autres mutants cotransfectés avec l'allèle WT. Il semble donc clairement établi, en tout cas pour ALK1, que les mutants NANDOR ne peuvent pas être transcomplémentés. Nous proposons donc que les mutants NANDOR sont dépourvus d'activité kinase. Cependant, la proportion élevée de mutation NANDOR d'ALK1 retrouvée sur des patients atteints d'HTAP (22 %) par rapport aux patients atteints d'HHT (3 %) (Girerd B. 2010) suggère une particularité de ces mutants NANDOR dans la signalisation ALK1. Je suggère de rechercher

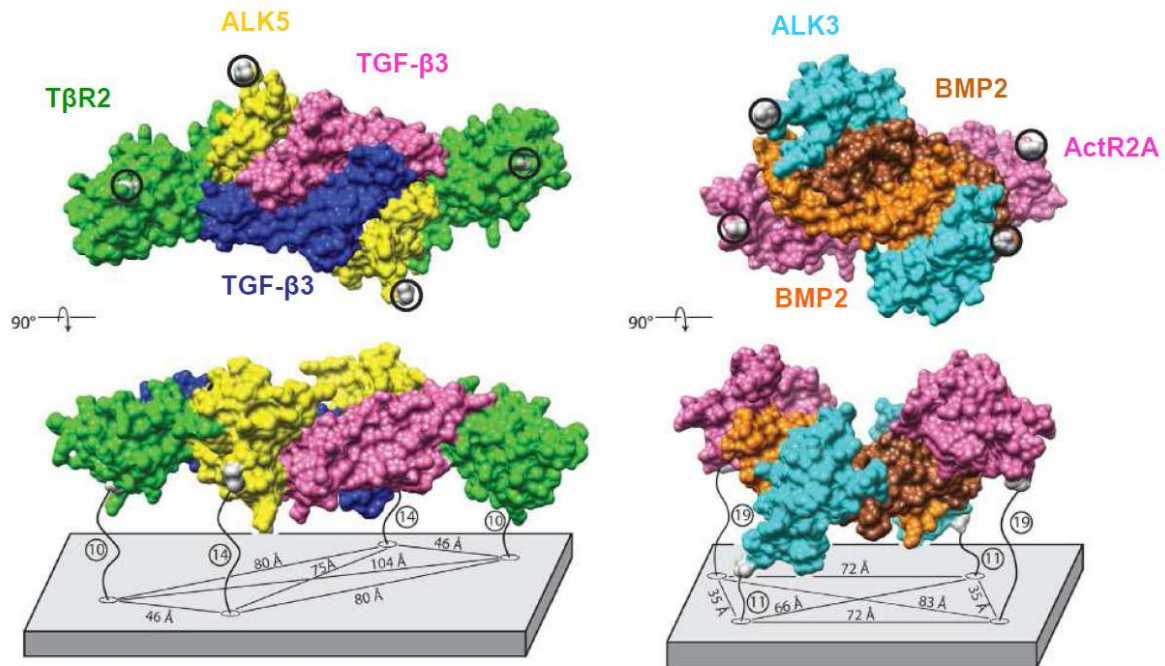


Figure 72 : Projection plane de la disposition des récepteurs de TGF-β3 et BMP2.

Distance entre les extrémités C-terminale des domaines extracellulaires des récepteurs. Les chiffres encadrés correspondent aux nombres de résidus entre le dernier résidu ordonné dans la structure et le premier acide aminé du domaine transmembranaire. Les distances entre les récepteurs de type 1 et de type 2 opposés (80 Å et 72 Å pour les récepteurs de TGF-β et BMP2 respectivement) sont suffisamment importantes pour réfuter toute transcomplémentation entre eux.

une modification d'interaction avec une ou des protéine(s) cytoplasmique(s) ou un effet différentiel sur les voies non-Smad entre les mutants kinases et les mutants NANDOR.

Je termine cette discussion en parlant de l'effet non dominant-négatif des mutants d'ALK1. Les études fonctionnelles précédemment réalisées montraient des effets dominants-négatifs de certains mutants d'ALK1 (Gu Y. 2006) (Fernandez L. A. 2006). L'analyse de la structure TGF- β /ALK5/T β R2 ainsi que l'utilisation du dimère TGF- β dont un seul monomère peut lier les récepteurs a permis de conclure que les deux dimères ALK5/T β R2 fonctionnent indépendamment (Huang T. 2011). L'analyse de la structure BMP2/ALK3/ActRII (réalisée par (Allendorph G. P. 2006)) a permis aux auteurs de conclure que la signalisation des BMPs étaient très certainement homologue à celle du TGF- β avec deux dimères indépendants ([figure 72](#)) (Huang T. 2011). Les récepteurs de type 1 apparaissent indépendants l'un de l'autre. Il est donc impossible d'avoir un effet dominant-négatif d'un mutant ALK1 sur un ALK1 WT. Les données récentes de la littérature et les structures des complexes valident ainsi nos résultats.

Conclusion et perspectives

Les mutations d'*ACVRL1* impliquées dans HHT-2 induisent une perte de la réponse d'ALK1 à BMP9. Cette perte n'affecte pas la signalisation de l'allèle sauvage. L'étude de la réponse d'un mutant ALK1 à BMP9 permet donc de discriminer les polymorphismes rares, actifs, des mutations pathogènes, inactives. Cette étude est très utile pour le conseil diagnostique. Une étude similaire sur les mutations ponctuelles de l'endogline, qui module positivement la réponse d'ALK1 à BMP9, pourrait aboutir également à un test diagnostique.

Nos données corréleront parfaitement avec l'idée d'un complexe de récepteurs composé de deux dimères ALK1/BMPR2 ou ActRIIA qui signalisent indépendamment l'un de l'autre. Les mutants NANDOR apparaissent alors comme des mutants de l'activité kinase et non de transactivation. Une recherche des interactions différentielles entre des protéines cytoplasmiques et les mutants NANDOR en comparaison aux autres mutants ainsi qu'une étude de l'affection des voies de signalisation non-Smad par les mutants NANDOR et les autres mutants pourraient expliquer la grande proportion de patients HTAP porteur d'une mutation NANDOR par rapport aux patients HHT porteur d'une mutation NANDOR.

Projet 2 : Structure du complexe ALK1/BMP9.

Introduction

Notre laboratoire a identifié BMP9 comme ligand spécifique d'ALK1 dans les cellules endothéliales (David L. 2007a). Nous avons aussi démontré que les mutations d'*ACVRL1* impliquées dans la maladie de Rendu-Osler corrélaient avec une haploinsuffisance de la signalisation BMP9 (Ricard N. 2010). Ce résultat suggère que l'augmentation de la voie BMP9 par un peptide mimant BMP9 et qui induirait une augmentation de la voie ALK1 pourrait être utilisée comme une stratégie thérapeutique pour traiter la maladie de Rendu-Osler. Dans ce but, nous avons besoin de comprendre le mécanisme moléculaire de l'interaction ALK1/BMP9. La structure du complexe ALK1/BMP9 nous permettra d'identifier les acides aminés de BMP9 impliqués dans la liaison à ALK1.

Plusieurs structures tridimensionnelles de complexe ligand/récepteurs de la famille TGF- β ont été réalisées. La structure de BMP2/ALK3/ActRII (Allendorph G. P. 2006) et de TGF- β 3/ALK5/T β R2 (Groppe J. 2008) ont permis de démontrer que les stratégies de liaison varient considérablement entre les membres de la famille. En effet, ALK3 et ActR2 lient de manière indépendante des sites différents de BMP2 (Allendorph G. P. 2006). Par contre, TGF- β lie d'abord T β R2 et ensuite seulement ALK5 (Groppe J. 2008). La haute affinité de BMP9 pour ALK1 ($EC_{50} = 45$ pg/mL par rapport à $EC_{50} = 20$ à 50 ng/mL pour les autres BMPs) suggère un troisième mode de liaison pour BMP9/ALK1, où BMP9 lierait d'abord ALK1 et ensuite le récepteur de type 2. La structure de BMP7 avec la noggine a mis en évidence une liaison de la noggine par insertion de la proline 35 dans une poche hydrophobe de BMP7 (Groppe J. 2002). ALK3 insère la phenylalanine 85 dans cette même poche (Kirsch T. 2000b). Or, cette phenylalanine est conservée dans l'ensemble des récepteurs ALK sauf ALK1 et la noggine ne peut pas lier BMP9. De plus, l'endogline, co-récepteur de BMP9, peut lier BMP9 sans l'aide d'un autre récepteur (Scharpfenecker M. 2007) (Castonguay R. 2011), alors que l'endogline a besoin du récepteur de type 1 ou de type 2 pour lier ses autres ligands (Barbara N. P. 1999). Ceci suggère que BMP9 lie ALK1 suivant un mécanisme différent des autres BMPs. La structure cristallographique de BMP9 a été réalisée (Brown M. A. 2005), cependant la structure du domaine extracellulaire d'ALK1 n'a pas encore été réalisée.

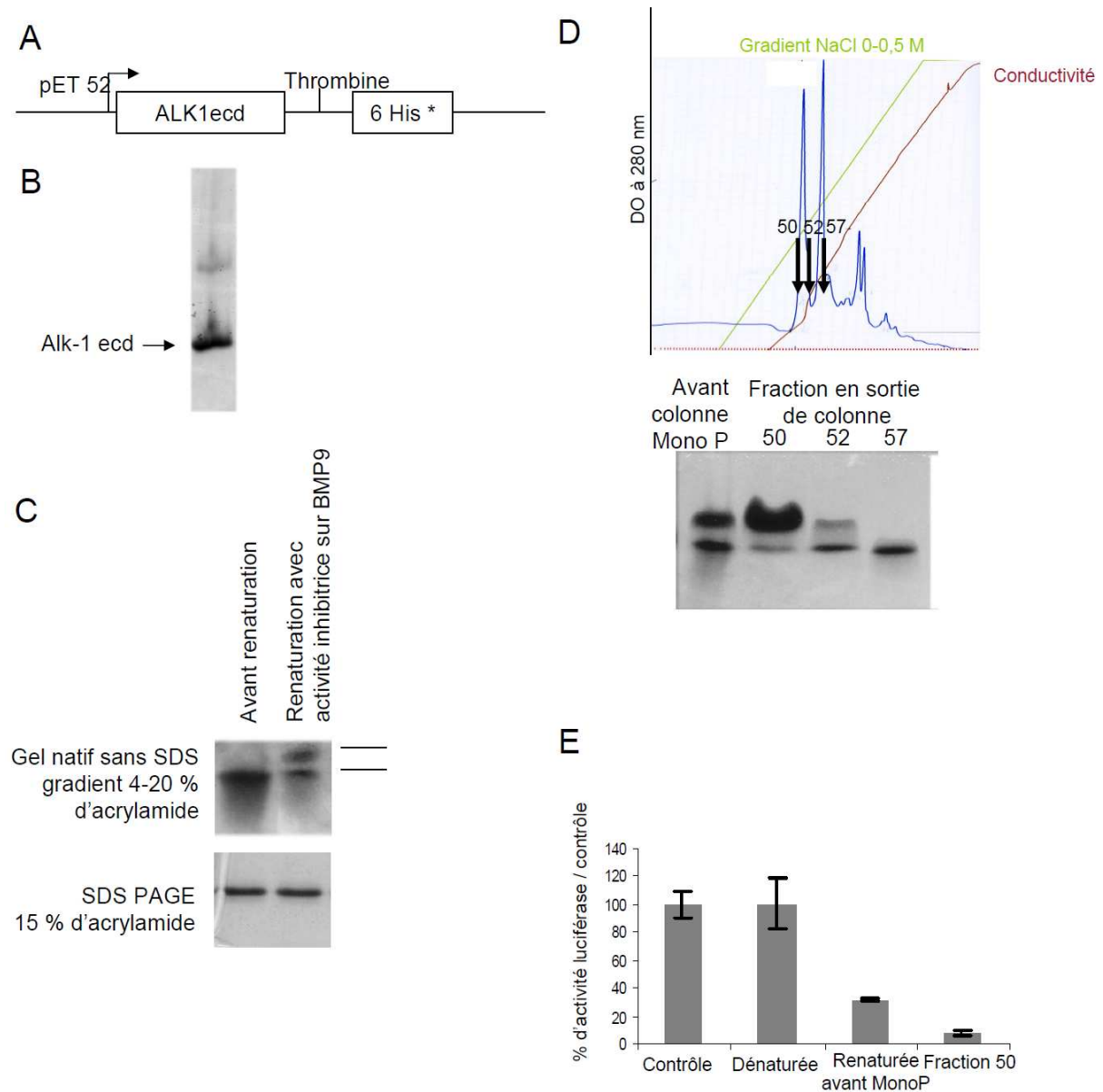


Figure 73 : Production d'ALK1ecd

A : Construction retenue pour la production : domaine extracellulaire d'ALK1 cloné dans pET52 avec une étiquette 6 His en C terminal.

B : Gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie de la production d'ALK1ecd après solubilisation et purification sur colonne de nickel.

C : Gel natif et gel SDS-Page colorés au bleu de Coomassie d'une production d'ALK1ecd active, c'est-à-dire capable d'inhiber l'activité BMP9 en BRE-luciférase après renaturation. Deux formes de la protéine sont visibles.

D : Séparation des deux formes d'ALK1ecd par colonne MonoP. Deux pics de DO à 280 nm sont visibles. Migration de fractions de sortie de colonne sur gel natif et coloration au bleu de Coomassie. Le premier pic de sortie de colonne correspond à la forme du haut sur gel natif.

E : Test d'activité d'ALK1ecd par inhibition de l'activité BMP9 en BRE-luciférase. La fraction contenant la bande du haut en gel natif est très active. Elle contient donc ALK1ecd renaturé.

Méthodes et résultats

1) Production du domaine extracellulaire d'ALK1 (ALK1ecd)

Afin d'obtenir une quantité importante de protéine sans glycosylation gênante pour l'obtention d'un cristal, la production d'ALK1ecd a été réalisée dans des cellules procaryotes. Pour trouver les conditions de production optimales, le domaine extracellulaire d'ALK1 (acides aminés 22 à 118 de la séquence d'ALK1 total, poids moléculaire 15 kDa) a été cloné dans trois vecteurs pour expression procaryote : pET52, pET22 et pET32 (Novagen). Le pET52 ajoute une étiquette 6-His en extrémité C-terminale derrière un site de clivage à la thrombine ([figure 73A](#)). Le pET22 permet une expression dans le périplasme de la bactérie, domaine où les ponts disulfures sont plus susceptibles de se former. Enfin pET32 permet de produire une protéine fusionnée à la thioredoxine (côté N-terminal de la protéine d'intérêt), ce qui augmente la solubilité de la protéine recombinante. Trois souches bactériennes ont aussi été testées : (1) Origami, qui est plus susceptible de former convenablement les ponts disulfures, (2) Rosetta, qui possède un épisode codant pour des ARNt rares chez les bactéries, (3) BL21. Sur une culture liquide à 37°C avec une densité optique DO = 0,6 à 686 nm, la production est induite avec 0.5 mM d'IPTG. Deux temps de production (5h ou sur la nuit) et trois températures (16°C, 22°C et 37°C) ont été testés.

Brièvement, deux conditions ont donné une production d'un niveau satisfaisant. 1) La production avec le plasmide pET32 dans la souche Rosetta à 37°C pendant 5 h donne une protéine soluble. Cependant, après un test d'activité par inhibition de la signalisation BMP9 dans le test BRE luciférase, nous avons trouvé cet ALK1ecd inactif (données non présentées). 2) Nous avons décidé alors de prendre la seconde condition : production avec le plasmide pET52 dans la souche Rosetta à 37°C pendant 5 h. Cette condition donne une protéine dans les corps d'inclusion. Un test de purification sur une petite production (4 mL) a été réalisé. Les bactéries sont lysées (20 mM Tris HCl pH = 8, 100 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 1 mM PMSF), puis soniquées. Après centrifugation, le culot contenant les corps d'inclusion est lavé (2 fois avec TBS, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF ; 1 fois avec TBS, 1 M urée, 1 mM PMSF ; 1 fois avec TBS). Les corps d'inclusion sont ensuite solubilisés (50 mM Na₂HPO₄ pH = 8, 300 mM NaCl, 6 M Guanidine Hydrochloride). Le surnageant est conservé. Une purification sur colonne de Nickel (Ni NTA, Qiagen) a été réalisée. Le surnageant est chargé sur la résine équilibrée dans le tampon de solubilisation. La résine est alors lavée avec le tampon de lyse des bactéries avec des concentrations croissantes en imidazole jusqu'à 25 mM. L'élution est

réalisée dans le tampon de lyse avec 300 mM imidazole (figure 73B). L'éluât est dialysé contre 50 mM HEPES NaOH pH = 7.5, 6 M Guanidine Hydrochloride, 25 mM DTT. Le dialysat est ultracentrifugé pour enlever tout agrégat. Afin de trouver rapidement les meilleures conditions de renaturation, nous avons utilisé le Renaturation Basic Kit for Protein (Fluka). Nous avons sélectionné 36 tampons sur les 50 du kit. Le surnageant ultracentrifugé est dilué 10 fois dans le tampon de renaturation et laissé 20 h à 4°C. Un test d'inhibition de l'activité BMP9 sur le BRE luciférase par les protéines renaturées a été réalisé. Les tampons de renaturation de pH = 7.5 à 8.5 avec le système d'oxydoréduction au glutathion et 200 mM NaCl semblent avoir bien renaturé notre protéine (par test d'inhibition de l'activité de BMP9 en test BRE luciférase, données non présentées). Une migration en gel natif (sans SDS ni β -mercaptoethanol) nous a permis de détecter deux conformations de la protéine, alors que la protéine dénaturée apparaît sous une seule forme (figure 73C). Afin de séparer les deux formes, nous avons utilisé une colonne MonoP (Pharmacia) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur charge de surface. L'élution se fait par un gradient de NaCl de 0 à 0.5 M dans un tampon HEPES pH = 7.5. Les fractions d'élution présentent deux pics à 280 nm, suggérant une séparation des deux formes (figure 73D). Nous avons confirmé cette séparation par migration sur un gel natif. L'activité de chaque forme est alors testée par inhibition de l'activité BMP9 en BRE luciférase. La fraction contenant la "bande du haut" de la migration sur gel natif contient une forme d'ALK1ecd active (figure 73E). La production d'ALK1ecd à petite échelle est donc réalisée. Une production à grande échelle doit maintenant être réalisée.

2) Production de BMP9 mature

BMP9, comme tous les ligands de la famille TGF- β , se présente sous la forme d'un propeptide contenant un prodomaine, un site de clivage aux furines convertases, et un domaine mature. Seule la forme mature de BMP9 nous intéresse pour la cristallographie du complexe ALK1/BMP9, le prodomaine n'interagissant pas avec le récepteur. Tout comme pour ALK1ecd, la production de BMP9 a été tentée dans les cellules procaryotes. Le domaine mature (acides aminés 320 à 429 de la séquence totale) a été cloné dans les mêmes vecteurs que pour ALK1ecd et les mêmes conditions de production ont été testées. Malheureusement, aucune des conditions n'a donné une production satisfaisante de la protéine. Les trois ponts disulfures intrachaînes plus le pont disulfure interchaîne de dimérisation rendent complexe la

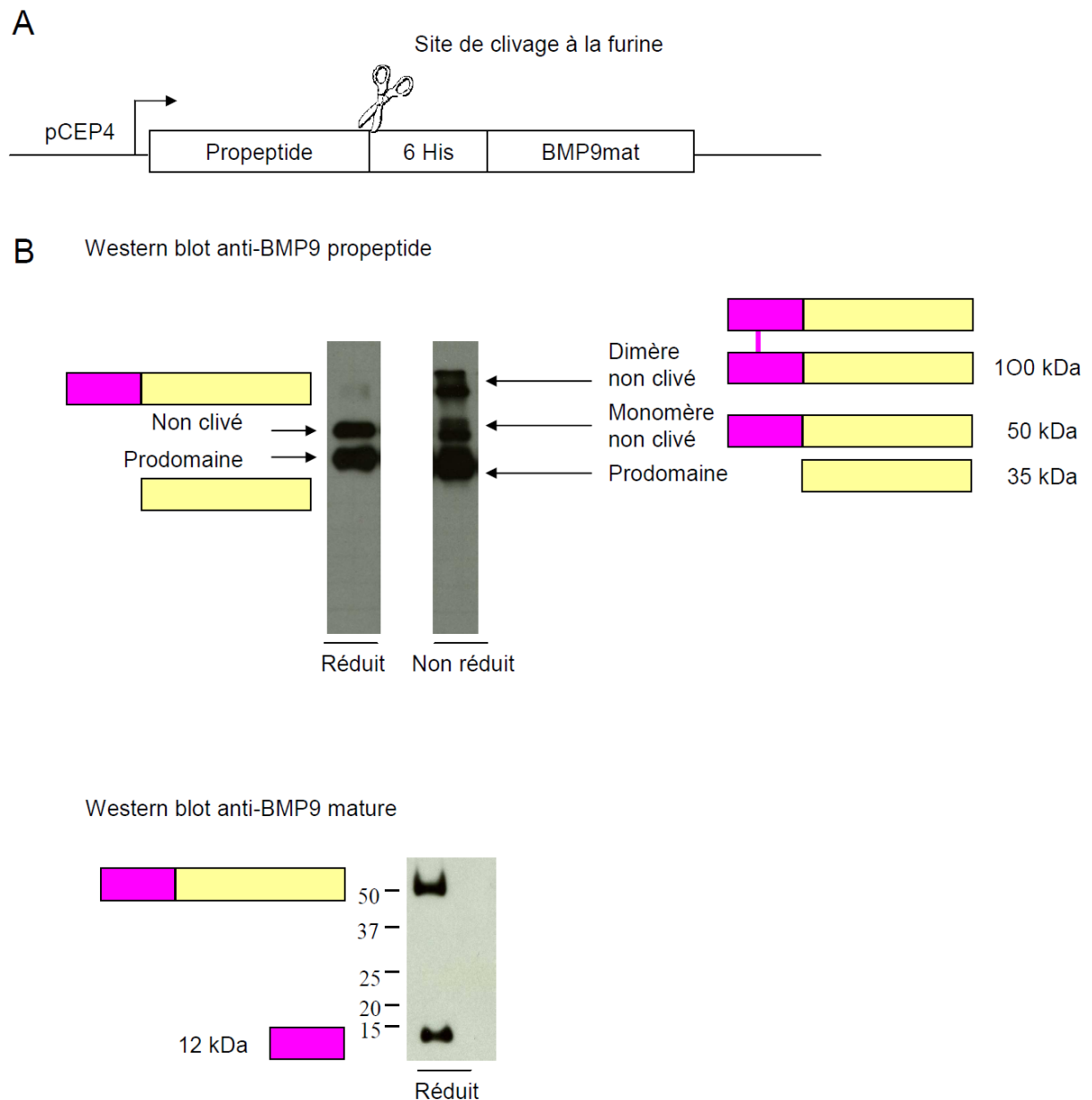


Figure 74 : Production de BMP9

A : Construction retenue pour la production : clonage de BMP9 total dans pCEP4 avec insertion de l'étiquette 6-His entre le prodomaine et la forme mature.

B : Western blot sur un surnageant de 293EBNA exprimant BMP9 recombinante avec un anticorps anti-prodomaine et anti-mature BMP9. Les cellules produisent du BMP9 dimérique sous forme proBMP9 et sous forme mature (clivée).

production de BMP9 en cellules procaryotes. Nous avons donc décidé de produire BMP9 en cellules eucaryotes.

BMP9 entier a été cloné dans le vecteur pCEP4 (Invitrogen). Une étiquette 6-His a été insérée entre le prodomaine et la forme mature de BMP9, en côté N-terminal de la forme mature (après le site de clivage aux furines convertases) (figure 74A). Le plasmide a été transfecté dans des cellules de mammifère 293EBNA, qui permettent de maintenir le vecteur pCEP4 sous forme épisomale et ne nécessite donc pas de sélection clonale. Les cellules transfectées sont sélectionnées avec de l'hygromycine. Après la sélection, lorsque les cellules sont à confluence, le sérum du milieu de culture est retiré et les cellules sont laissées 48 h. Le surnageant de culture est alors collecté. Afin de vérifier la production, les protéines de 1 mL de surnageant sont précipitées à l'acide trichloroacétique et un western blot sur gel en condition réductrice ainsi qu'en condition non réductrice est réalisé. Les anticorps anti-BMP9 mature (R&D) et anti-prodomaine BMP9 (R&D) nous ont permis de visualiser que BMP9 était bien produit, sous une forme clivée (prodomaine clivée de la forme mature) et non clivée (figure 74B). Cette production mélangeant une forme clivée et non clivée avait été retrouvée pour la production de TGF-beta (Shi M. 2011). Le niveau de production est cependant relativement faible, mais la protéine est active en test BRE-luciférase (données non présentées).

Afin d'augmenter le rendement de production, plusieurs stratégies sont à l'épreuve. 1) Le sous-clonage de BMP9 dans pCDNA3.1, vecteur qui s'intègre dans le génome des cellules, suivi d'une sélection clonale. 2) Sous-clonage d'ALK1ecd dans un vecteur de production eucaryote (avec son peptide signal) et cotransfection d'ALK1ecd et de BMP9 afin de produire les deux protéines dans la même cellule. La forte affinité de ces deux protéines pourrait aboutir à la production d'un complexe très stable.

Conclusion

Le projet est encore loin d'être abouti. La production d'ALK1 à grande échelle et l'augmentation du rendement de la production de BMP9 sont nécessaires pour espérer obtenir une quantité suffisante des protéines pour la cristallographie du complexe. L'objectif est de produire 1 à 10 mg de chaque protéine. La cristallographie sera réalisée en collaboration avec J.L. Ferrer de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

Projet 3 : Analyse de l'angiogenèse des souris BMP9 -/-.

Contexte de l'étude

Les souris invalidées pour ALK1 et l'endogline présentent des défauts majeurs de l'angiogenèse conduisant à une létalité embryonnaire (Urness L. D. 2000) (Oh S. P. 2000) (Bourdeau A. 1999) (Arthur H. M. 2000). Des données *in vivo* et *in vitro* montrent un rôle de BMP9 dans l'angiogenèse (David L. 2008) (Scharpfenecker M. 2007). Notre hypothèse est que BMP9 est un facteur de maturation de l'angiogenèse et/ou de quiescence de l'endothélium.

Objectifs de l'étude

Etablir le rôle de BMP9 *in vivo* dans :

- 1) L'angiogenèse physiologique.
- 2) L'angiogenèse tumorale.

Méthodologie

Les souris invalidées pour BMP9 ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Dr. Teresa Zimmers et le Pr. Se-Jin Lee du Johns Hopkins University School of Medicine de Baltimore. Ces souris sont viables et fertiles. Des données confidentielles non publiées suggèrent que ces souris développent un phénotype HHT après quelques mois. Ces souris sont un modèle de choix pour étudier l'effet de BMP9 sur l'angiogenèse 1) physiologique et 2) tumorale.

1) Nous avons choisi de regarder l'angiogenèse de la rétine pour étudier l'angiogenèse physiologique. Ce modèle est simple et est souvent utilisé pour l'étude de l'angiogenèse physiologique. Comme je l'ai dit dans l'introduction, la vascularisation de la rétine se développe la première semaine après la naissance chez la souris. La rétine se couvre alors de vaisseaux formant un réseau très structuré avec des artères, des veines, et des capillaires. Le

recouvrement des vaisseaux par les péricytes, qui constitue une étape majeure dans la phase de maturation de l'angiogenèse, est aussi visualisable sur la vascularisation de la rétine.

2) Nous allons aussi utiliser des modèles de tumeurs par injections de cellules cancéreuses en sous-cutané afin d'étudier l'effet de BMP9 sur l'angiogenèse tumorale.

Résultats

Les résultats sont présentés sous forme d'un article en cours de préparation.

J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées ainsi que l'acquisition des photographies par microscopie confocale et les analyses des images, excepté le test de l'activité des sera en BRE-luciférase. C. Mallet m'a aussi apporté une aide ponctuelle pour le génotypage des souris KO BMP9.

Manuscript in preparation

BMP9 as a regulator of mouse retina vascular density

Nicolas Ricard^{1,2,3}, Sandrine Levet^{1,2,3}, Christine Mallet^{1,2,3}, Teresa Zimmers⁴, Se-Jin Lee⁵, Jean-Jacques Feige^{1,2,3} and Sabine Bailly^{1,2,3}

¹INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), U1036, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

²CEA (Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives), iRTSV (Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant)/BCI (Biologie du Cancer et de l'Infection), France

³Université Joseph Fourier, Grenoble, France

⁴Division of Surgical Oncology, DeWitt Daughtry Family Department of Surgery, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL, USA.

⁵Department of Molecular Biology and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, USA.

Introduction

BMP9 is a member of the TGF- β family. Circulating BMP9 binds with a high affinity to two receptors, ALK1 and endoglin^{1 2 3}. ALK1 is a type I receptor of the TGF- β receptor family and is almost exclusively expressed by endothelial cells⁴. Endoglin is a coreceptor of this family and is highly expressed in the endothelium⁵. The invalidation of ALK1 in mice leads to embryonic lethality at E 11 due to major angiogenesis defects^{6 7}. The invalidation of endoglin in mice leads also to embryonic lethality due to similar angiogenesis defects⁸. The knock out of BMP9 (BMP9 KO) has not published yet and little is known about the role of BMP9 in vivo.

BMP9 was described as a factor regulating the maturation phase of angiogenesis since BMP9 inhibits HMVECd (Human MicroVascular Endothelial Cells from dermis) migration and proliferation^{1 3}. Moreover, BMP9 can block ex-vivo endothelial sprouting from metatarsals³ and in vivo FGF-2 induced angiogenesis in a sponge implanted subcutaneously on mice². However, BMP9 has also been shown to promote proliferation and migration of some

endothelial cell lines in contrast with its effect on HMVECd ⁹. The role of BMP9 in angiogenesis is therefore not clearly understood yet.

To address this issue, we examined the role of BMP9 in vascular development of the neonatal retina. Retina of newborn mice is avascular and development of retinal blood vessels occurs during the first week after birth to form an organized vascular network ¹⁰. Blood vessels grow from the center of the retina to the periphery and generate a plexus composed of arteries, veins and capillaries. Endoglin is expressed in all retinal blood vessels at P7 but expression is markedly higher in the veins and in the reorganizing capillaries (ahead of the vein), behind the tip cells. In contrast, ALK1 is expressed fairly uniformly in endothelial cells of retinal arteries, veins, and capillaries ¹¹. Using endoglin inducible KO in endothelial cells, it was recently shown that absence of endoglin in retinas induced a delayed remodeling of the capillary plexus, increased endothelial proliferation and localized AVMs ¹¹. Interestingly, ALK1 inducible KO in endothelial cells have also been described and studied for vascularization of the retina (Mahmoud, Hematology reports 2011). Increased branching or AVMs were also observed. However, interestingly deficiency of ALK1 in postnatal mice led to lethality within 48 hours. Differences in vascular plexus remodeling, vascular branching and maintenance of arterial/venous identity were observed between the ALK1 and the endoglin KO, suggesting that these two receptors might not have exactly the same function in angiogenesis. It was also recently described that ALK1ecd could strongly affect retina vascularization suggesting that a ligand for ALK1 is important in retina angiogenesis ¹².

In the present work, we investigated the role of BMP9 on retinal angiogenesis. We studied the effect of blocking BMP9 either using BMP9 KO mice or neutralizing BMP9 antibodies in WT mice in comparison to the extracellular domain of ALK1 (ALK1ecd). Although we could not identify a clear vascular defect in BMP9 KO in the angiogenesis of the retina, we found that blocking BMP9 with its neutralizing antibody led to a denser vascular plexus in the developing vascular network of the retina of newborn mice.

Methods

Mice

KO BMP9 mice were a generous gift from Pr. Se-Jin Lee and Dr. Teresa Zimmers. KO BMP9 mice are in C57BL/6 genetic background. Briefly, a sequence of the pPGK-Neo-polyA

plasmid was introduced in the second exon of the BMP9 gene, excluding completely the mature region..

Reagents

rmALK-1/Fc (770-MA R&D systems) and anti-hBMP-9 monoclonal (clone 360107, MAB3209 R&D systems) were prepared at 2 µg/µL. Injections were done intraperitoneally in P1 and P3 newborn mice with respectively 5 µL and 10 µL of the previously prepared treatment.

BrdU (B-5002, sigma) was freshly diluted in PBS and injected i.p. in P6 mice at 50 mg/kg. Two hours later mice were sacrificed.

Retinal whole mount staining

P6 mice were decapitated and enucleations were performed. Eyes were fixed 2 hours in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) in PBS at room temperature (RT) and then washed in PBS. Retina isolation was performed as described in ¹³. Retinas were fixed 30 min in 4% PFA at RT and then saturated and permeabilized overnight in 1 % BSA, 1 % Triton X-100 in PBS at 4°C. Retinas were then incubated 1 h at RT with biotinylated Isolectin B4 (L2140, Sigma) and Rabbit anti-NG2 antibody (homemade) diluted in wash buffer (1 % BSA, 0,5 % Tween in PBS) at 50 µg/mL. Retinas were washed 5 x 20 min with wash buffer at RT. Retinas were then incubated 1 h at RT in Streptavidin AlexaFluor 488 conjugate (S11223, Invitrogen) diluted at 5 µg/mL and Donkey anti Rabbit Cy3 antibody (711-165-152, Jackson ImmunoResearch) (dilution 1:200) in wash buffer. Retinas were washed 5 x 20 min at RT and then overnight at 4°C with wash buffer. Mounting of stained retinas was performed as described ¹³. Observations were made using confocal microscopy (Leica, iRTSV CEA Grenoble). In order to evaluate the number of branching point per field, an average of 12 fields per region (front or capillary plexus) were taken for each retina.

Cell lines

NIH-3T3 fibroblasts cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium, 4.5 g/L glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest; Abcys).

Human dermal microvascular endothelial cells (HMVECd, Cambrex) were maintained in endothelial growth medium (EGM-2-MV, Cambrex) supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS, Cambrex).

Reporter gene constructs

The reporter plasmid pGL3(BRE)2-luc encoding firefly luciferase downstream of a BMP response element was kindly provided by Dr P. ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). The pRL-TKluc plasmid encoding renilla luciferase downstream of the thymidine kinase promoter was purchased from Promega.

DNA transfection and dual luciferase activity assay

NIH-3T3 cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) using lipofectamine (Invitrogen) with 0.1 µg pGL3(BRE)2-luc, 0.02 µg of pRL-TKluc, and different doses of plasmids encoding WT-ALK1 or the different mutants. Four hours after transfection, cells were treated with or without recombinant BMP9 (100 pg/mL; R&D Systems) for 15 hours. Firefly and renilla luciferase activities were measured sequentially with the Dual- Luciferase reporter assay (Promega).

Western blot analysis

Cells were serum-deprived for 1 hour and then stimulated with BMP9 (100 pg/mL) for 1 hour. Cells were then washed twice with PBS and lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer with a cocktail of protease inhibitors (P8340; Sigma-Aldrich). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 10%) and analyzed by immunoblotting with anti-phosphoSmad1/5 (41D10; Cell Signaling Technology) and anti- α -tubulin (generously provided by Dr D. Job, Inserm U366, Grenoble, France).

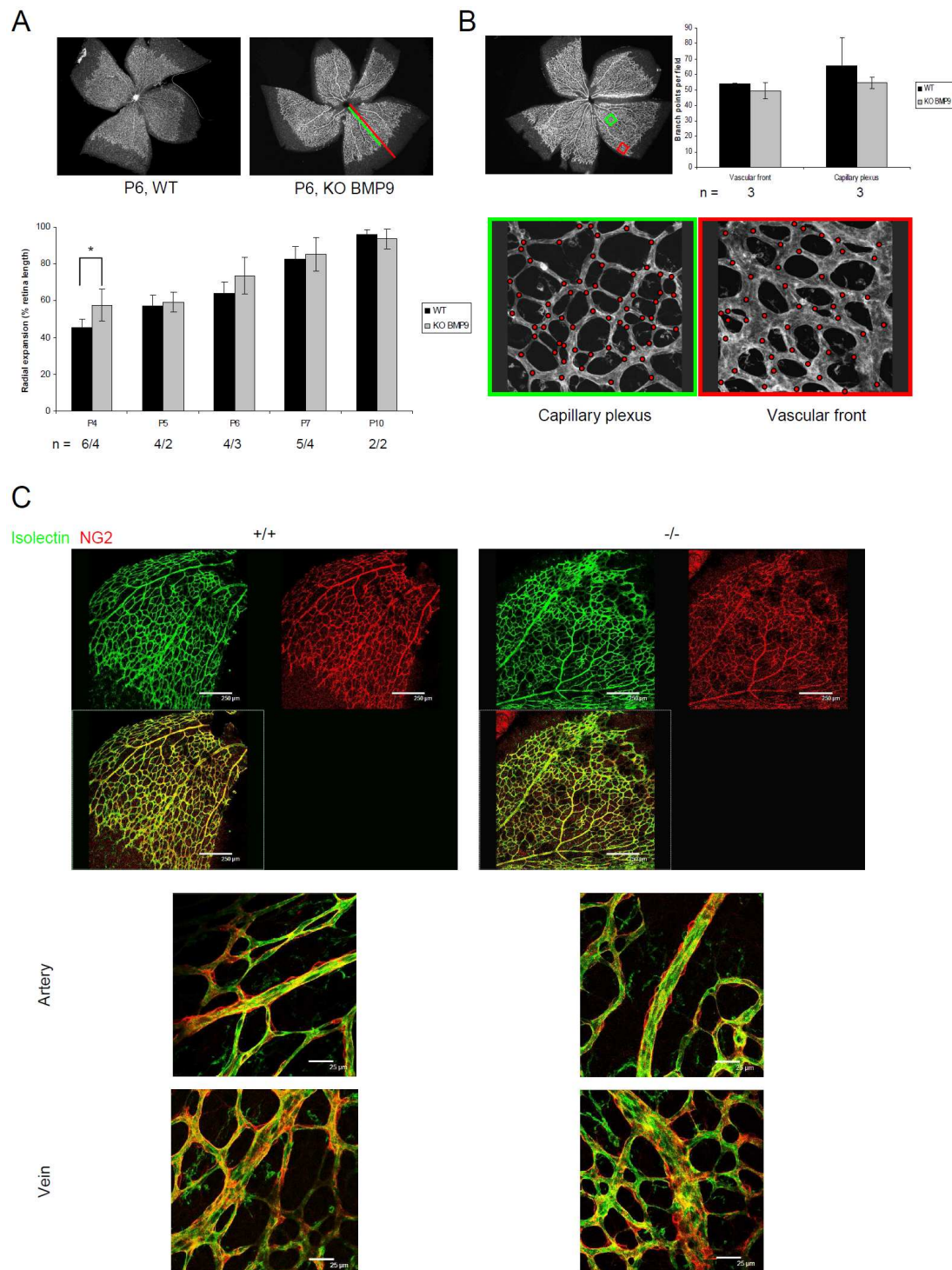


Figure 1 : BMP9 KO mice have a slight increase in radial expansion of the vascular plexus

A: Newborn mice were killed between P4 and P10. After isolectin-B4 labeling, radial expansion of the vascularization of each retina (green line) and retina length (red line) were measured using the ImageJ software. Results are given in % of the retina length. (* Pvalue < 0.05 using the Mann-Whitney test, n: number of retinas).

B: Between 20 and 30 pictures of each P6 retina were taken using confocal microscopy. The number of branch points per field were counted.

C: Retinas of P6 mice were labeled with isolectin-B4 and anti-NG2 antibody. Focus on an artery and a vein of WT and BMP9 KO retinas.

Results

BMP9 KO mice have a slight increase in radial expansion of the vascular plexus

To investigate the effect of BMP9 on physiological angiogenesis *in vivo*, we analyzed retinal angiogenesis in BMP9 KO mice in comparison to WT mice.

We observed no obvious defect in the organization of the vascular network. The veins and the arteries were well differentiated, organized, and we did not detect any shunts between them (Fig. 1A, top panel). Then, we investigated if the progression of the retinal vessels was affected by the loss of BMP9. Mice were killed between 4 and 10 days after birth and the radial expansion of the vascular network was measured (Fig. 1B). We observed a slight increase of the radial expansion on day 4 in BMP9 KO in comparison to WT mice, but this delay was compensated at later time points (day 5 until day 10).

To investigate the vascular density, we quantified the number of branching points at the migration front and at the capillary plexus on P6 retina (Fig 2B). The numbers of branching points per field were not significantly different between WT and BMP9 KO mice.

Lastly, we studied vessel coverage by pericytes and/or smooth muscle cells using an antibody directed against NG2. NG2 is a proteoglycan expressed by pericytes and smooth muscle cells¹⁴. We did not observe any difference in the coverage of the vessels between WT and BMP9 KO mice at P6 (Fig. 1C). In both WT and BMP9 KO mice, arteries were well covered by mural cells, and veins and capillaries were less covered, as expected.

Neutralization of BMP9 *in vivo* leads to an increase of the vascular density of the retina

Having seen no clear effect of the inactivation of BMP9 on the vascularization of the retina, we next studied the effect of an acute blockage of BMP9 using a neutralizing anti-BMP9 antibody. We compared the effect of this neutralizing antibody to ALK1ecd which has been previously shown to perturb vascularization of the retina.

We first injected ALK1ecd or anti-BMP9 antibodies intraocularly at P3, and sacrificed mice at P6 or P8. We did not observe any difference between mice receiving ALK1ecd, or anti-BMP9 antibodies and control (PBS) mice (data not shown). We thus decided to inject these neutralizing proteins as early as from P1. Two injections at P1 and P3 were done, but due to technical difficulties, these injections were done intraperitoneally. Mice were killed at P6 and

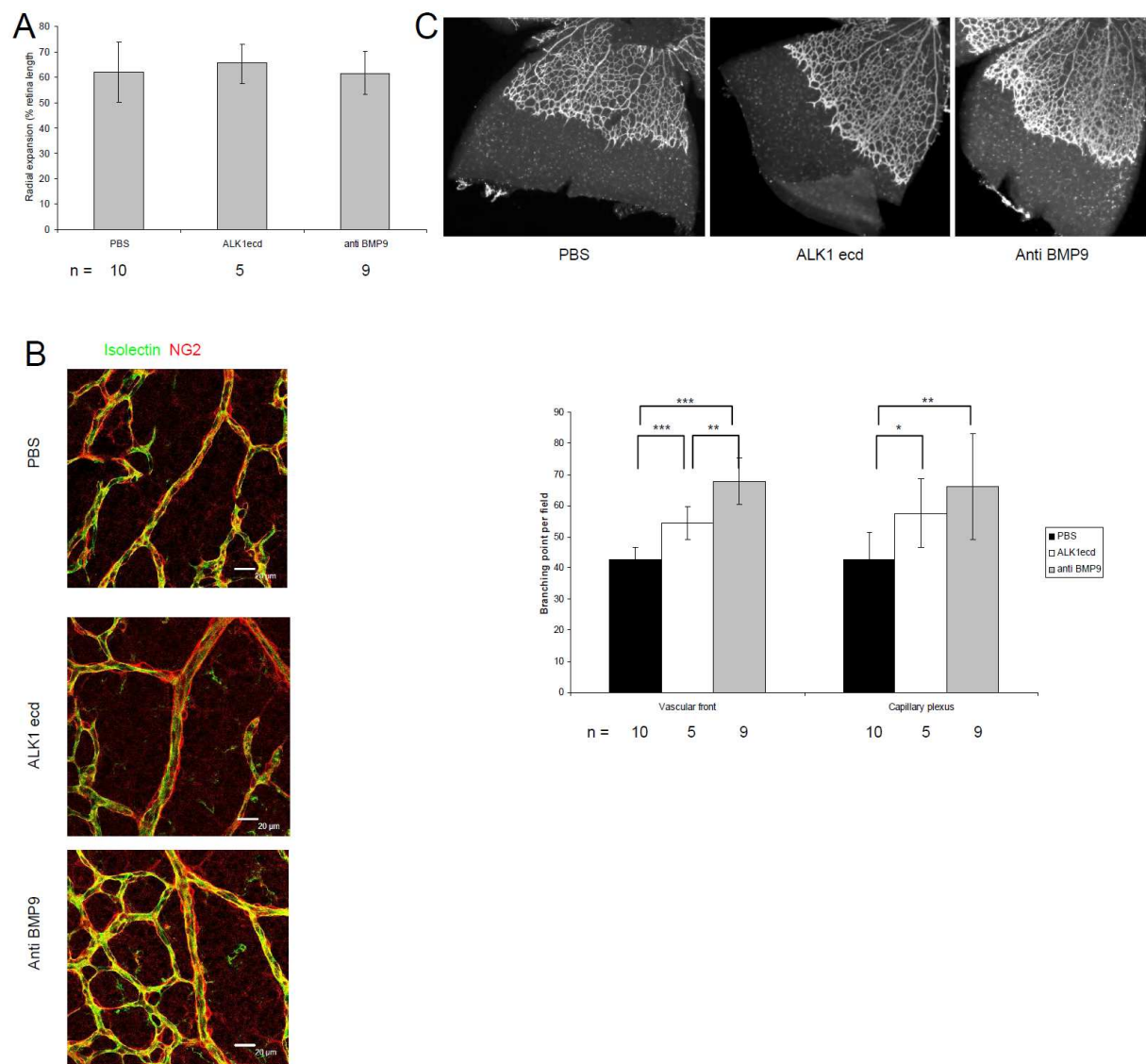


Figure 2 : Acute blockage of BMP9 increases vascular density of mice retinas.

A: Measures of the radial expansion of the vascularization of P6 retinas.

B: P6 retinas were labeled with Isolectine-B4 and anti-NG2 antibody.

C: Between 20 and 30 pictures of each P6 retina were taken using confocal microscopy. The number of branch points per field were counted.

(* Pvalue < 0.05, ** Pvalue<0.01, *** Pvalue<0.001 using the Mann-Whitney test, n: number of retinas).

the retinal vascularisation was observed. We first studied the radial expansion of the vasculature. We did not notice any difference between the different treatments (Fig. 2A). The coverage of the vessels by mural cells did not seem to be affected (Fig. 2B). However, the density of the vasculature was significantly increased when ALK1^{ecd} or anti-BMP9 antibodies were injected as compared to the control mice (Fig. 2C). The density of the vasculature was increased both at the front of migration but also at the capillary plexus. The density at the vascular front was significantly higher in anti-BMP9 antibody-treated mice compared to ALK1^{ecd} treated mice.

How can we explain the differences observed between BMP9 KO mice and anti-BMP9 treatment?

One possibility could be that BMP9 KO mouse adapt to BMP9 deletion. We therefore studied whether the absence of circulating BMP9 could be compensated by another circulating ligand of the BMP family. To do this, plasmas from BMP9 KO mice and WT mice were compared for their ability to activate the Smad1/5/8 pathway. NIH-3T3 fibroblasts, were first transfected with an ALK1-encoding plasmid and the BRE (BMP Responsive Element) plasmid. These cells were then stimulated with 0.5 % plasma from WT or BMP9 KO mice. Luciferase activity was detected in response to WT plasma, whereas no luciferase activity could be detected following BMP9 KO plasma stimulation (Fig. 3A). This result led us to think that there is no functional compensation of BMP9 in BMP9 KO mice. However, we could not exclude that another ligand could be circulating at a low dose that would not be detectable in 0.5% plasma, or under an inactive form which could be further activated.

To detect a possible ALK1 ligand circulating at low concentration, we stimulated NIH-3T3 transfected cells with 10 % serum from WT or BMP9 KO mice in the absence or presence of ALK1. NIH-3T3 cells do not express endogenous ALK1 but do express ALK2/3/4/5 and so can be stimulated by several cytokines of the TGF- β family¹⁵. In β -gal-transfected cells, 10 % plasma from WT or BMP9 KO mice induced a similarly low activation of the BRE. In ALK1-transfected cells, 10% WT plasma induced a strong BRE response, while 10 % BMP9 KO plasma barely activated the BRE pathway (Fig. 3B). We also tested these plasma on the activation of the Smad1/5/8 pathway on primary endothelial cells (HMVECd, Human MicroVascular Endothelial Cells from dermis) to make sure that we were not missing the presence of a factor that could circulate in an inactive form that could only be locally activated by endothelial cells. For example, BMP10, which we previously described as a

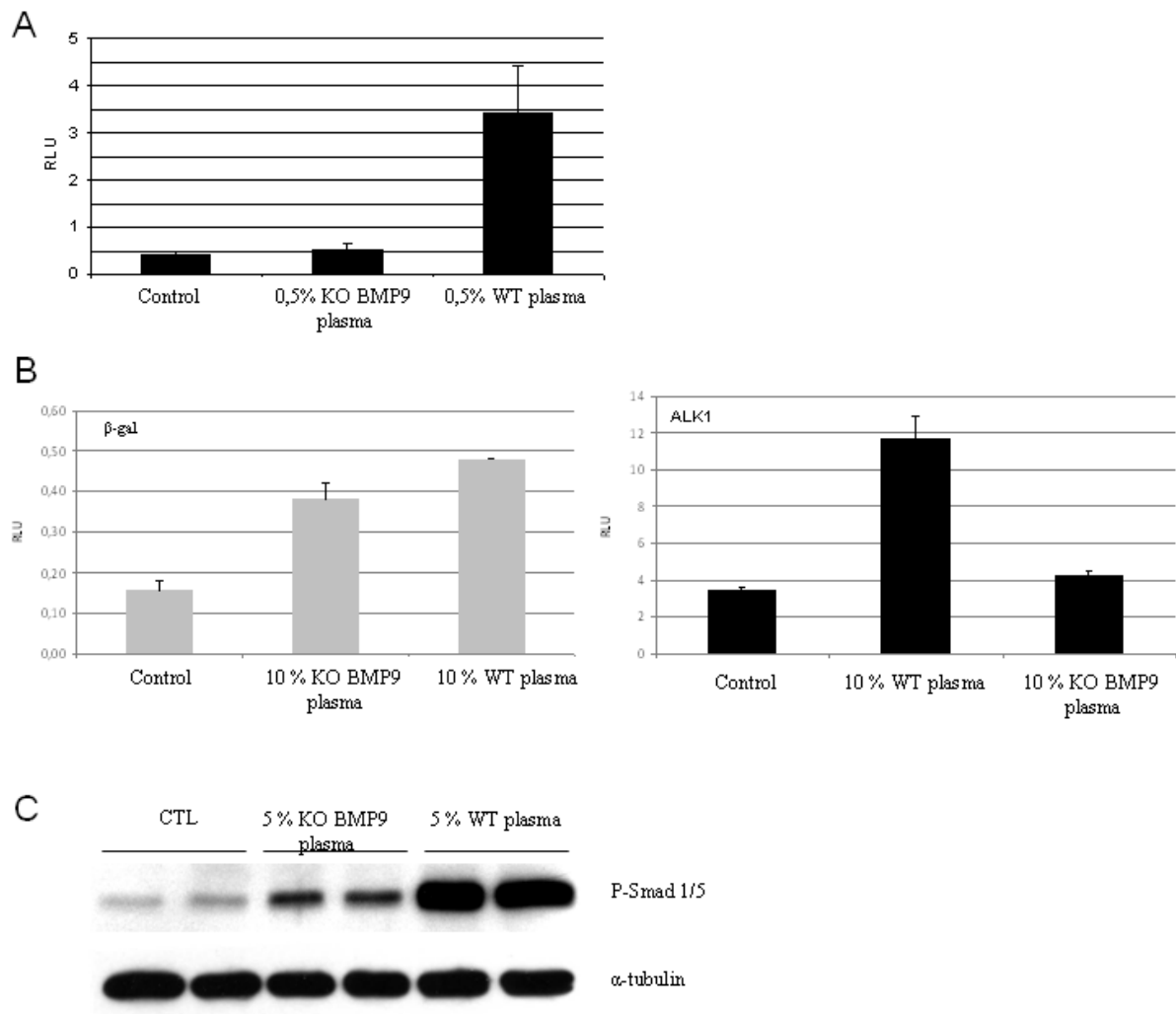


Figure 3 : Is there another circulating compensatory ALK1 ligand in KO BMP9 mice?

A: NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and WT ALK1. After 4 hours, cells were treated with 0,5 % KO BMP9 or WT plasma for 15 hours. The luciferase activities were then measured. The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity.

B: NIH-3T3 cells were transiently transfected with pGL3(BRE)₂-luc, pRL-TK-luc, and WT ALK1 (right) or β-gal (left). After 4 hours, cells were treated with 10 % KO BMP9 or WT plasma for 15 hours. The luciferase activities were then measured. The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity.

C: HMVECd were starved for 1 hour and then treated with 5 % KO BMP9 or WT plasma for 1 hour. Cell lysates (20 µg proteins) were resolved by 10 % SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against phosphoSmad1/5 and α-tubulin (loading control).

ligand for ALK1¹, has been described to be inactive when complexed to its prodomain¹⁶. HMVECD were stimulated with 10 % plasma from WT or BMP9 KO mice and Phospho-Smad1/5/8 was detected by Western Blot. We could detect a phosphorylation of Smad1/5 in HMVECD in response to 10 % plasma from BMP9 KO, but at a much lower level than with 10 % plasma from WT mice (Fig. 3C). Taken together, these data demonstrate that some circulating cytokines could activate the Smad1/5/8 pathways in serum from BMP9-KO mice, but that this activation is weak and seems to be ALK1 independent.

Discussion

This study has revealed the importance of BMP9 in the remodeling of blood vessels in postnatal angiogenesis. Indeed, in the present work, we demonstrate that blocking BMP9 using a neutralizing anti-BMP9 antibody increased vascular branching of the retina in a similar manner as the extracellular domain of ALK1 (ALK1ecd).

BMP9 KO mice are viable, on the contrary of ALK1 KO mice and Endoglin KO mice⁶⁻⁸ and do not present an evident phenotype. This suggests that another ALK1 ligand can compensate the absence of BMP9 or that the effect of ALK1 or endoglin deletion is ligand-independent. We have previously shown that BMP10 can also bind to ALK1 with a strong affinity¹. Due to the strong expression of *BMP10* at the embryonic stage¹⁷, we first hypothesized that embryonic levels of BMP10 could compensate the loss of BMP9 for the embryonic vascular remodeling. However, it was since shown that loss of ALK1 at an adult stage leads to the death of the animal some weeks after, demonstrating the absolute need of ALK1 also after the embryonic stage¹⁸. Moreover, we could show, in accordance to two other works, that *BMP10* can also be expressed in adult mice and therefore we cannot completely exclude that BMP10 might take the place of BMP9.

Retinal angiogenesis allowed us to study easily physiologic angiogenesis. Studying the structure of the network, the radial expansion of the vasculature, the coverage of the vessels by mural cells, and the density of the vasculature, we did not observed any defect in BMP9 KO mice compared to the WT mice (Fig. 1). This is not what we would have expected as absence of endoglin or ALK1 impaired retinal angiogenesis¹⁹. Indeed, loss of endoglin or ALK1 at P2 led to retinal angiogenesis defects with shunts between veins and arteries, a delay in the vascular expansion and an increase in the endothelial cell proliferation. Compensation in our BMP9 KO mice by another ALK1 ligand was suspected.

The ability of serum from BMP9 KO mice to stimulate the Smad1/5/8 pathway was therefore studied using two methods (the BRE activity and the Smad1/5/8 phosphorylation). The BRE activity in NIH-3T3 cells revealed a low but still detectable activation of the Smad1/5/8 pathway by BMP9 KO serum (Fig. 3A). This activation is well below the one observed with WT serum, demonstrating that there is not a total compensation for the loss of BMP9 in the BMP9 KO mice. Further, the activity of the BMP9 KO serum doesn't seem to be ALK1 dependent (Fig. 3B). We have also tried to study the level of Phospho-Smad1/5 in endothelial cells in vivo by labeling aorta rings with an anti-PhosphoSmad1/5. Unfortunately, we did not succeed in performing such labeling. So for the moment we do not know if the remaining BRE/phosphoSmad1/5 activity detected in BMP9 KO serum would be enough to compensate the role of circulating BMP9. We plan to use siRNA directed against ALK1 in HMVECd and neutralizing anti BMP10 antibody and ALK1ecd to test if the activation of the Smad1/5 pathway in response to BMP9 KO sera is ALK1-dependent and to test if this activity is due to circulating BMP10.

Blockade of ALK1 circulating ligand(s) by ALK1ecd was recently published ¹². The authors demonstrated the necessity of ALK1 circulating ligand(s) for the lymphangiogenesis in the tail dermis and for the retinal angiogenesis of newborn mice. Since our BMP9 KO mice did not have a vascular phenotype, we decided to use a neutralizing anti-BMP9 antibody to study the effect of BMP9 on retinal angiogenesis in comparison with ALK1ecd. We observed a significant increase in the number of branching points demonstrating that addition of ALK1ecd increased vascular density. Interestingly, addition of neutralizing anti-BMP9 antibody also increased the number of branching points. These data would suggest that the ligand trapped by ALK1ecd is BMP9. These data are in accordance with the increase in endothelial proliferation observed in absence of endoglin or ALK1 ¹⁹. We will need to check if the increase in branching points is due to an increase in endothelial cell proliferation.

We did not see any arteriovenous shunt in retinas from ALK1ecd or anti BMP9 treated animal while Endoglin or ALK1 loss led to such shunts ¹¹. Loss of function mutations of Endoglin and ALK1 are found in a vascular dysplasia called HHT. In this disease, direct connection between arteries and veins are seen in patients. The loss of endoglin in mice was expected to give such shunts and we expected to see these connections with the loss of the ligand, BMP9. The absence of arteriovenous shunt could be explained by the partial inactivation of BMP9 with ALK1ecd or anti-BMP9. Indeed, injections in newborn mice (P1 and P3) is technically difficult, and the dose of the treatment really injected could be lower than the expected. We

cannot exclude that a non-circulating ALK1 ligand might not be neutralized by the ALK1ecd and maintained an activity leading to a mild phenotype, different to the loss of ALK1 or Endoglin. Also, a possible effect of ALK1 and endoglin in a ligand independent manner cannot be excluded and can also account for these differences between the loss of one of the receptor and the loss of BMP9. In this case, a basal activity of the kinase of ALK1 independently of the ligand has to be present. Indeed, mutations in ALK1 found on HHT patients are loss of function mutations in response of BMP9²⁰ and mutations in Smad4 are found on patient with HHT combined to the juvenile polyposis syndrome²¹. Moreover, foetus carrying two HHT related mutations die in utero²². Altogether, these data are in accordance for a major role of the ALK1 kinase activity in ALK1 pathway, and exclude a major role of ALK1 independently of its kinase activity.

In order to determine the mechanism leading to this increase, we plan to study the proliferation of the endothelial cells. Mice have been injected with BrdU and killed 2 hours later. Retina will be labeled with anti BrdU soon and positive nuclei will be counted in the different conditions. Moreover, we will examine the number of tip cells and of filopodia per tip cells in order to determine if the increase of density is due to a similar phenotype than the increase of density following an inactivation of Dll4²³. We could suspect a regulation of the Notch signaling by BMP9.

A loss of Dll4 has been shown to increase in the number of sprout in the retinal vasculature and to increase in the vascular density²³. Another Notch ligand, Jagged1, as opposite effect on the vascular network since it antagonizes the effect on the Dll4/Notch1 pathway²⁴. Our data could suggest a link between BMP9/ALK1 and Notch. Indeed, we have previously data suggesting that BMP9 increases Dll4 (data not shown).

The lack of vascular phenotype in BMP9 KO mice although neutralizing BMP9 antibody leads to an increase in vascular density could suggest that the remaining activity of the BMP9 KO serum is sufficient to keep an ALK1 pathway normal. This remaining activity may be due to circulating BMP10, but further investigation need to be done to prove it. To test this hypothesis, we have injected ALK1ecd, which can trap every circulating ALK1 ligand, in KO BMP9 mice at P1 and P3, and killed mice at P6. Retinas are under investigation and results should give us information about a possible other circulating ALK1 ligand. BMP10 KO is lethal due to heart defect¹⁷. It will be very interesting to cross inducible BMP10 KO mice with BMP9 KO mice and to induce the loss of *BMP10* after the heart formation or at the adult stage. Such mice without BMP9 and BMP10 will be compared to mice lacking ALK1 or

endoglin. A lack of strong phenotype in mice lacking BMP9 and BMP10 would lead to the hypothesis of another ligand for ALK1.

References

1. David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.J. & Bailly, S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953-1961 (2007).
2. David, L., *et al.* Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* **102**, 914-922 (2008).
3. Scharpfenecker, M., *et al.* BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* **120**, 964-972 (2007).
4. Panchenko, M.P., Williams, M.C., Brody, J.S. & Yu, Q. Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol* **270**, L547-558 (1996).
5. Quackenbush, E.J., Gougos, A., Bauml, R. & Letarte, M. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* **136**, 118-124 (1986).
6. Urness, L.D., Sorensen, L.K. & Li, D.Y. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* **26**, 328-331 (2000).
7. Oh, S.P., *et al.* Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2626-2631 (2000).
8. Li, D.Y., *et al.* Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* **284**, 1534-1537 (1999).
9. Suzuki, Y., *et al.* BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci* **123**, 1684-1692 (2010).
10. Fruttiger, M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* **10**, 77-88 (2007).
11. Mahmoud, M., *et al.* Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res* **106**, 1425-1433 (2010).
12. Niessen, K., Zhang, G., Ridgway, J.B., Chen, H. & Yan, M. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood* **115**, 1654-1661 (2010).
13. Connor, K.M., *et al.* Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* **4**, 1565-1573 (2009).
14. Ozerdem, U., Grako, K.A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E. & Stallcup, W.B. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* **222**, 218-227 (2001).
15. Mazerbourg, S., *et al.* Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J Biol Chem* **280**, 32122-32132 (2005).
16. Sengle, G., Ono, R.N., Sasaki, T. & Sakai, L.Y. Prodomains of transforming growth factor {beta} (TGF{beta}) superfamily members specify different functions: Extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* (2010).

17. Neuhaus, H., Rosen, V. & Thies, R.S. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech Dev* **80**, 181-184 (1999).
18. Park, S.O., *et al.* Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **119**, 3487-3496 (2009).
19. Mahmoud, M., Pia Cumine, A., Oh, S. & Arthur, H.M. Characterisation of arteriovenous malformation development in two inducible mouse models of HHT1 and HHT2. *Hematology reports* **3**, 24 (2011).
20. Ricard, N., *et al.* Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* **116**, 1604-1612 (2010).
21. Gallione, C.J., *et al.* SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* **43**, 793-797 (2006).
22. Karabegovic, A., Shinawi, M., Cymerman, U. & Letarte, M. No live individual homozygous for a novel endoglin mutation was found in a consanguineous Arab family with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* **41**, e119 (2004).
23. Hellstrom, M., *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780 (2007).
24. Benedito, R., *et al.* The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **137**, 1124-1135 (2009).

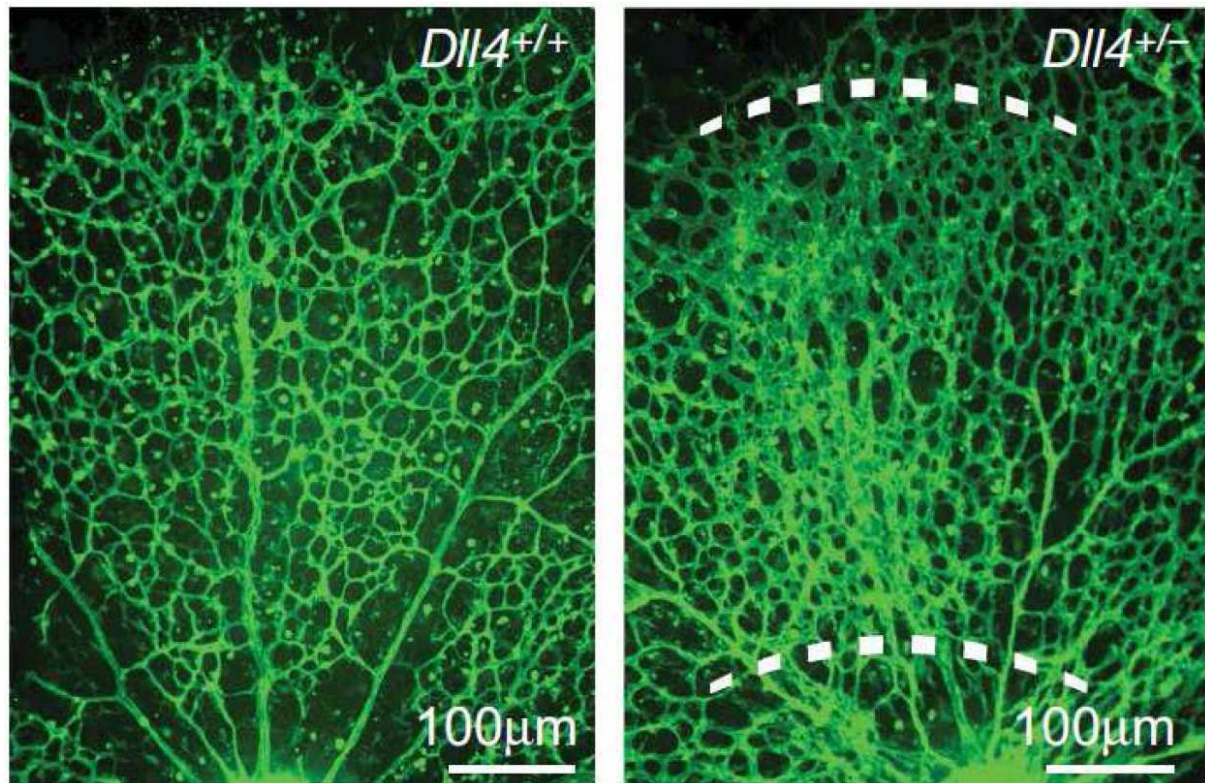


Figure 75 : Augmentation de la densité vasculaire de la rétine des souris hétérozygotes pour *Dll4*.

D'après (Hellstrom M. 2007).

Discussion

La neutralisation de BMP9 avec un anticorps anti-BMP9 ou une forme soluble du récepteur ALK1 conduit à une augmentation de la densité vasculaire de la rétine. Cette augmentation correspond au phénotype décrit dans les invalidations de la voie Dll4-Notch1 (figure 75). La voie Notch est une voie de signalisation entre cellules adjacentes. Le ligand de la voie Notch, ici Dll4, est transmembranaire. Le récepteur, ici Notch1, est aussi transmembranaire. La liaison de Dll4 sur Notch1 induit le clivage du domaine intracellulaire de Notch1 (appelé NICD pour Notch IntraCellular Domain) qui est alors transporté dans le noyau où il opère des effets transcriptionnels. L'invalidation hétérozygote de Dll4 induit une vascularisation plus dense des vaisseaux sanguins de la rétine consécutive à un bourgeonnement excessif (Hellstrom M. 2007). Inversement, la surexpression de Dll4 conduit à une baisse du bourgeonnement des cellules endothéliales, liée à une diminution de la prolifération et à une réduction de la migration des cellules endothéliales, aboutissant à un réseau vasculaire moins dense (Trindade A. 2008). L'invalidation de Jagged1, autre ligand de la voie, diminue la densité de la vascularisation (Benedito R. 2009). Lors du dernier congrès sur les BMPs, l'équipe d'An Zwijsen a présenté un travail sur l'invalidation de Smad1/5 dans les cellules endothéliales. Cette invalidation entraîne une dérégulation de l'expression de Dll4. Ces résultats confortent notre hypothèse d'une interaction entre la voie de BMP9 et la voie Notch. Au vu de nos résultats sur la densité vasculaire, la neutralisation de BMP9 pourrait induire soit une augmentation de Jagged1, soit une diminution de Dll4. Des résultats préliminaires en PCR quantitative menés dans notre laboratoire indiquent que la stimulation par BMP9 de cellules endothéliales en culture induit l'expression de Dll4, ce qui serait en accord avec nos résultats *in vivo* (données non publiées). Des essais de marquages Dll4 et Jagged1 ont été tentés sur les rétines des animaux traités. Malheureusement, aucun marquage n'a été détecté. De nouveaux tests avec des conditions de marquages différentes vont être réalisés prochainement.

Nous avons commencé à étudier l'angiogenèse tumorale dans les souris invalidées pour BMP9. Des cellules de carcinome de poumon de Lewis (LLC pour Lewis Lung Carcinoma) en suspension dans du Matrigel ont été injectées en sous-cutané. Ces cellules expriment le gène de la luciférase nous permettant de suivre la croissance tumorale par luminescence. Les tumeurs sont mesurées toutes les 48 h au pied à coulisse. Nous avons

réalisé une première expérience où nous n'avons pas observé de différence de la croissance tumorale entre les souris invalidées pour BMP9 et les souris sauvages. Cependant, dans cette première expérience, nous avons une grande variété interindividuelle (données non présentées). Suite à des difficultés d'élevage, cette expérience préliminaire a été faite sur un nombre d'animaux faible (4 animaux dans chaque groupe). De plus, les animaux étaient âgés (autour de 1 an). Nous allons refaire des essais avec des animaux plus jeunes, un plus grand nombre de souris (afin d'atténuer la dispersion des résultats). Nous allons également utiliser une lignée cancéreuse de mélanome (B16F10) décrite comme particulièrement angiogénique. Ces travaux permettraient de donner une explication sur l'efficacité des neutralisants de la voie ALK1 (récepteur soluble ALK1-Fc ou anticorps monoclonal anti-ALK1) actuellement développés (Hu-Lowe D. D. 2011) (Mitchell D. 2010) (Cunha S. I. 2010). En effet, il a été démontré qu'ALK1-Fc inhibe BMP9 et BMP10 (Mitchell D. 2010). De plus, une étude récente avec de l'endogline soluble, qui neutralise BMP9 et BMP10, montre aussi une diminution de la croissance tumorale lors d'administration de cette forme soluble d'endogline (Castonguay R. 2011). Cependant, aucune étude n'a directement et spécifiquement neutralisé BMP9. Les mécanismes d'action d'ALK1-Fc ou de l'anticorps anti-ALK1 ne sont pas clairs. Hu-Lowe et collaborateurs proposent un rôle proangiogénique d'ALK1 pour expliquer les effets de la neutralisation de la voie ALK1 (Hu-Lowe D. D. 2011). Notre hypothèse serait plutôt que BMP9 agit sur la quiescence de l'endothélium vasculaire (David L. 2008) et sur la phase de maturation (Lamouille S. 2002) pendant l'angiogenèse (notamment en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales). Ainsi, nous pensons que BMP9 pourrait arrêter la migration des cellules endothéliales et leur prolifération dans un contexte angiogénique, et que BMP9 est un facteur de quiescence dans un contexte non angiogénique. Un blocage de BMP9 dans un contexte angiogénique impliquerait une perturbation de la phase de maturation de l'angiogenèse, aboutissant à des vaisseaux peu fonctionnels, ce qui desservirait la tumeur.

L'augmentation de l'angiogenèse dans la rétine par l'injection d'ALK1-Fc et la réduction de l'angiogenèse tumorale par la même molécule peut sembler contradictoire. Cependant, le blocage de Dll4, facteur de quiescence de l'endothélium, a donné les mêmes résultats. En effet, la diminution de Dll4 induit une angiogenèse excessive dans la rétine (Hellstrom M. 2007) et le blocage de Dll4 dans une tumeur induit une angiogenèse excessive mais non fonctionnelle avec une diminution de la perfusion de la tumeur, une hypoxie plus importante de la tumeur et une diminution de sa croissance (Noguera-Troise I. 2006)

(Ridgway J. 2006). Nous pouvons penser que l'inhibition d'ALK1 dans la tumeur a le même effet. Le flux sanguin au sein d'une tumeur dans une souris traitée avec du ALK1-Fc est d'ailleurs diminué (Hu-Lowe D. D. 2011). Un lien entre les voies ALK1 et Dll4 semble donc de plus en plus probable.

La différence entre le phénotype des souris invalidées pour BMP9 et l'effet de la neutralisation de BMP9 (avec l'anticorps anti-BMP9) peut s'expliquer par une adaptation des souris invalidées pour BMP9. De plus, le fond génétique de nos souris (C57BL/6) n'est pas favorable aux phénotypes vasculaires. Nous avons donc commencé à changer le fond génétique de nos souris pour les obtenir dans un fond Balb/c et 129/Ola, plus favorables pour les phénotypes vasculaires (Rohan R. M. 2000) (Shaked Y. 2005).

Conclusion

Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis plusieurs avancées dans la compréhension de la signalisation des BMPs, dans l'établissement d'un modèle moléculaire de la maladie de Rendu-Osler de type 2, ainsi que dans la détermination du rôle de BMP9 dans l'angiogenèse physiologique.

Une application concrète de mon travail sur la maladie de Rendu-Osler est l'établissement d'un test diagnostique permettant de discriminer les mutations pathologiques d'*ACVRL1* des polymorphismes rares. Ce test est maintenant utilisé par le Service de génétique moléculaire et clinique de l'hôpital Edouard Herriot de Lyon.

Mon étude sur la maladie de Rendu-Osler a permis de proposer comme modèle de maladie l'haploinsuffisance fonctionnelle de la voie d'ALK1 en réponse à BMP9.

Ce travail sur les différents mutants d'ALK1 m'a également permis d'apporter une contribution dans la compréhension de la signalisation des BMPs et de montrer que la queue NANDOR est aussi importante pour ALK1, et probablement pour l'ensemble des récepteurs de type 1. En effet, mon étude sur les mutants NANDOR a permis de montrer le rôle de la queue NANDOR dans l'activité kinase des récepteurs et non dans l'activation des récepteurs de type 1 par le récepteur de type 2 (transactivation) comme précédemment décrit (Garamszegi N. 2001). De plus, j'ai démontré que la transcomplémentation, qui consiste en l'activation d'un récepteur de type 1 mutant de transactivation grâce à un autre récepteur de type 1 défaillant dans son domaine kinase, ne se produisait pas pour ALK1. Depuis, ces résultats ont été confortés par une autre publication (Huang T. 2011). Cette notion de transcomplémentation a également été remise en question pour ALK5. L'ensemble de ces données suggère une absence de transcomplémentation pour l'ensemble des récepteurs de la famille.

La maladie de Rendu-Osler se caractérise par des fistules artério-veineuses. L'inactivation conditionnelle d'ALK1 a permis de montrer que les fistules se développent en réponse à un stimulus angiogénique et semblent donc être la conséquence d'une angiogenèse dérégulée en absence d'ALK1 (Park S. O. 2009) (Walker E. J. 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que l'inactivation partielle de la voie ALK1 dans la maladie de Rendu-Osler conduit à une angiogenèse excessive en cas de stimulus angiogénique. L'efficacité de

l'Avastin dans les essais cliniques sur les patients atteints de la maladie de Rendu-Osler est en accord avec cette hypothèse. Mes travaux préliminaires *in vivo* montrent que l'inactivation de la voie ALK1 dans des souriceaux (en utilisant ALK1ecd-Fc ou anti-BMP9) donne une vascularisation de la rétine plus dense. Même si à ce jour nous ne comprenons pas encore les causes de cette augmentation de la densité (dérèglement de la voie Notch et/ou hyperprolifération des cellules endothéliales), l'angiogenèse physiologique de la rétine semble hyperactivée lors de l'inactivation d'ALK1. Les résultats de mes études *in vivo* et sur la maladie de Rendu-Osler vont donc dans le sens qu'une perte de la voie BMP9/ALK1 aboutit à une angiogenèse excessive. Ces résultats suggèrent un rôle de la voie BMP9/ALK1 dans la maturation de l'angiogenèse et/ou la quiescence de l'endothélium. Au vu des résultats publiés sur l'efficacité des inhibiteurs de la voie ALK1 (ALK1-Fc ou anti-ALK1) dans les modèles murins de tumeurs, nous pouvons penser qu'inhiber un facteur de maturation ou de quiescence aboutit à une angiogenèse accrue mais peu fonctionnelle et donc dessert la tumeur. L'inhibition du facteur de quiescence Dll4 montre une efficacité antitumorale. Ces résultats suggèrent donc une piste d'étude intéressante pour développer des thérapies anti-angiogéniques de deuxième génération, complétant les thérapies anti-angiogéniques existantes, celles de première génération visant la voie du VEGF.

Perspectives

Perspectives

L'étude de la signalisation d'ALK1 en réponse à BMP9 ne fait que commencer. Cette étude peut avoir des répercussions sur nos connaissances sur la signalisation BMP en général ainsi que sur le mécanisme moléculaire de la maladie de Rendu-Osler, l'angiogenèse et d'autres fonctions mal connues de BMP9.

1) Signalisation BMP : relation entre les récepteurs au sein du complexe.

La structure cristallographique du complexe domaine extracellulaire d'ALK1/forme mature de BMP9 peut être le début d'une étude sur les interactions entre les récepteurs, notamment entre les deux dimères récepteur de type 1/récepteur de type 2. En effet, la connaissance des acides aminés impliqués dans la liaison de BMP9 sur ALK1 nous permettra de faire par mutagenèse dirigée un mutant de BMP9 incapable de se lier aux récepteurs. La production d'hétérodimère de BMP9 composé d'un monomère de BMP9 sauvage, donc capable de se lier aux récepteurs, et d'un monomère de BMP9 muté, donc sans capacité de fixation sur les récepteurs, nous permettra d'avoir un ligand capable de lier un seul dimère de récepteur de type 1/récepteur de type 2. Ainsi, si une signalisation Smad1/5/8 est maintenue par cet hétérodimère de BMP9, nous pourrions en conclure qu'un dimère de récepteur de type 1/récepteur de type 2 est suffisant pour induire la signalisation, et que les deux dimères du complexe de signalisation fonctionnent indépendamment l'un de l'autre. Cette démonstration confirmerait nos résultats sur la signalisation des mutants d'ALK1, qui n'ont pas d'effet dominant-négatif en réponse à BMP9. Ce modèle de dimère indépendant dans l'hétérotétramère de récepteurs a été démontré pour le TGF- β (Huang T. 2011).

2) Voie de signalisation Smad-indépendante.

Le mécanisme d'activation des voies Smad-indépendantes, notamment des voies JNK et p38, est peu clair. En effet, s'il est établi que l'ubiquitine ligase TRAF6 active TAK1 en réponse à une stimulation TGF- β , activant alors les voies JNK et p38, l'utilité de l'activité kinase d'ALK5 dans cette activation de TRAF6 est sujette à controverse (Yamashita M. 2008) (Sorrentino A. 2008). Il serait ainsi intéressant d'étudier le mécanisme d'activation des voies Smad-indépendantes par ALK1. Ces voies sont très importantes dans le contrôle de la migration des cellules endothéliales (David L. 2007b). Cependant aucun mécanisme d'activation n'est connu. De plus, un motif consensus de liaison de TRAF6 a été retrouvé sur

ALK5 et ALK6 uniquement (Sorrentino A. 2008). Il semble donc probable que l'activation des voies Smad-indépendantes par ALK1 ne passe pas par TRAF6. Les différents mutants réalisés pour l'étude de la voie Smad en réponse à BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler peuvent être un outil pertinent pour étudier le rôle de l'activité kinase d'ALK1 dans la signalisation Smad-indépendante. Ces résultats pourraient aboutir à un mécanisme général de l'activation des MAPKs par les BMPs. L'étude des voies Smad-indépendantes est particulièrement importante pour comprendre la spécificité d'activité de BMP9 sur les cellules endothéliales (inhibiteur de la migration et de la prolifération) par rapport aux effets proangiogéniques des autres BMPs.

3) Autre ligand pour ALK1 ou rôle d'ALK1 ligand indépendant.

Concernant la signalisation ALK1 plus précisément, la différence flagrante du phénotype de nos souris invalidées pour BMP9 par rapport aux souris invalidées pour ALK1 nous suggère qu'un ligand d'ALK1 compense la perte de BMP9. BMP10, l'autre ligand physiologique d'ALK1, n'est pas décrite comme circulante. Cependant, une présentation au dernier congrès sur les BMPs à Louvain par Thomas Braun suggère une possible circulation de BMP10. Dans le cas d'une circulation de BMP10 qui permettrait de compenser au moins partiellement la perte de BMP9 dans nos souris, la contribution exacte de BMP10 circulante et de BMP9 circulante dans la signalisation d'ALK1 serait très intéressante à étudier. Une autre explication de la différence de phénotype entre la souris invalidée pour ALK1 et pour BMP9 peut être une signalisation d'ALK1 indépendante d'un ligand ou un rôle d'ALK1 indépendant de son activité kinase. D'un point de vue personnel, un rôle d'ALK1 indépendant de son activité kinase m'apparaît peu probable, suite à la mortalité *in utero* des fœtus porteurs de deux allèles d'*ACVRL1* mutés (Snyder L. 1944) (Karabegovic A. 2004) (El-Harith el H. A. 2006) (Wooderchak W. 2010). Un rôle ligand-indépendant pourrait être testé en réalisant une souris génétiquement modifiée qui exprimerait un mutant d'ALK1 incapable de lier BMP9/BMP10 (réalisable après la cristallographie du complexe) mais localisé à la membrane plasmique. Ce projet reste lourd techniquement.

4) Test diagnostique pour HHT-1 et HTAP.

L'haploinsuffisance fonctionnelle de la réponse à BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler de type 2 a été démontrée par mes travaux. Il serait intéressant de mener une étude similaire sur des mutations d'endogline afin de déterminer si la perte d'un allèle de l'endogline (dans le cadre de mutations "frameshift" ou de mutations non-sens) ou si une endogline mutée

sur un acide aminé diminue la réponse à BMP9. La forte affinité de BMP9 pour l'endogline (Scharpfenecker M. 2007) (Castonguay R. 2011), inhabituelle en comparaison avec les autres ligands de l'endogline, suggère une implication de la voie BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler de type 1 également. Notre test diagnostique pourrait alors permettre de discriminer les mutations ponctuelles pathologiques des polymorphismes rares pour les mutations de l'*Endogline*. Dans le cadre d'une diminution de la voie BMP9 lors d'une mutation de l'*Endogline* liée à la maladie de Rendu-Osler de type 1, il serait judicieux d'étudier si la mutation a un effet dominant-négatif sur l'allèle sauvage. En effet, contrairement à ALK1, l'endogline dimérise par un pont disulfure. La conservation d'une activité d'un dimère endogline sauvage/endogline mutée ne paraît pas évidente et mérite une étude.

Le développement d'un test diagnostique pour les mutations de BMP9 impliquées dans l'HTAP peut aussi être intéressant.

5) Souris invalidées pour BMP9 et maladie de Rendu-Osler.

Il n'y a à ce jour aucune preuve directe de l'implication de BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler. En effet, même si nos travaux ont démontré une diminution de moitié de l'activité de la voie BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler de type 2, aucune mutation de BMP9 n'a été trouvée sur des patients et l'implication de BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler de type 1 n'est pas démontrée. Le sérum de la souris invalidée pour BMP9 présente une capacité d'activation de la voie Smad1/5/8, sur des cellules endothéliales en culture, faible mais existante. Il semble donc que la voie Smad1/5/8 ne soit pas complètement abolie dans les cellules endothéliales de ces souris, mais simplement diminuée. Ces souris pourraient donc être un bon modèle de la maladie de Rendu-Osler. Les fistules artério-veineuses peuvent se développer suite à un stimulus angiogénique ou inflammatoire et augmentent lors du vieillissement. Il semble donc qu'une observation des vaisseaux sanguins, notamment dans les sites fréquents de fistules chez les patients HHT (foie/poumon/système nerveux central), sur des souris âgées (> 1 an) soit une stratégie intéressante. De plus, la réponse de ces souris à un stimulus angiogénique, inflammatoire ou à une blessure pourrait conduire à la visualisation de fistules. Dans ce cas, une première preuve de l'implication de BMP9 dans la maladie de Rendu-Osler serait apportée.

6) Régulation de l'activité de BMP9.

L'haploinsuffisance fonctionnelle de la voie BMP9 chez les patients atteints de la maladie de Rendu-Osler de type 2 suggère qu'une augmentation de la voie ALK1 pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace. L'étude de la régulation de l'expression d'ALK1 et de BMP9 pourrait apporter des cibles thérapeutiques. Le taux de BMP9 circulant dans le sérum humain est de 2 à 10 ng/mL. L'EC₅₀ de BMP9 étant autour de 50 pg/mL, il semble que la voie ALK1 soit saturée *in vivo*. Cependant, l'ajout de BMP9 exogène sur les vaisseaux de la CAM de poulet induit une réponse par augmentation du tonus vasculaire (David L. 2008). Ce résultat suggère que la voie d'ALK1 n'est pas saturée à l'état basal par le BMP9 circulant. Il semble donc que des régulateurs de l'activité de BMP9 au niveau de l'endothélium neutralisent une partie du BMP9 circulant. A ce jour, aucun des régulateurs des BMPs connu n'a d'action sur BMP9. L'étude de la régulation de l'activité de BMP9 sur l'endothélium vasculaire peut permettre de mettre à jour une cible thérapeutique dans la maladie de Rendu-Osler. Un potentiel régulateur de l'activité de BMP9 *in vivo* serait la circulation de récepteur soluble. L'endogline peut être clivée par une protéase et est capable de neutraliser BMP9 (Castonguay R. 2011). L'étude de la régulation de ces clivages semble donc particulièrement importante afin de mieux cerner la régulation de l'activité BMP9 *in vivo*.

Les taux d'endogline soluble étant très élevés dans la pré-éclampsie (Venkatesha S. 2006), la voie BMP9 pourrait être fortement inhibée dans cette pathologie. Une étude du rôle de la voie BMP9 dans cette pathologie semble donc être de tout premier intérêt. Cependant, cette pathologie est spécifique de l'espèce humaine et aucun modèle animal satisfaisant n'existe, ce qui rend les études particulièrement difficiles.

7) Mécanisme moléculaire de l'HTAP.

L'HTAP est une maladie dont les mécanismes moléculaires sont peu connus. Bien que les mutations de *BMPR2* soient un facteur de prédisposition à la maladie, le mécanisme moléculaire reliant la voie des BMPs et l'HTAP n'est pas complètement établie. En effet, les gènes du tonus vasculaire dérégulés dans l'HTAP ne sont pas des cibles connus de la voie des BMPs ou ne varient pas dans le sens attendus (l'endothéline1 est induite par la voie des BMPs (Star G. P. 2010), alors que chez les patients qui ont une voie des BMPs altérée, le taux d'endothéline1 est augmenté (Cacoub P. 1993)). L'étude transcriptionnelle de la voie des BMPs, spécifiquement de la voie ALK1/BMPR2 semble donc intéressante afin de pouvoir mieux comprendre l'HTAP. La régulation de BMPR2 semble aussi particulièrement

importante, les patients sans mutation de BMPR2 présentant un taux de BMPR2 inférieur aux personnes saines (Atkinson C. 2002). Une meilleure compréhension de la régulation du taux de BMPR2 pourrait aboutir à la découverte de cibles thérapeutiques.

8) Fonctionnement d'ALK1-Fc.

La poursuite de l'étude *in vivo* de l'inactivation de la voie ALK1 par ALK1-Fc et anti-BMP9 peut aboutir au mécanisme d'action d'ALK1-Fc. Une analyse fine de l'angiogenèse tumorale de souris traitées avec anti-BMP9 ou ALK1-Fc pourrait montrer un bourgeonnement plus important des vaisseaux tumoraux que dans les tumeurs des souris non traitées, mais une perfusion de la tumeur diminuée. Si ces résultats sont atteints, l'inhibition des voies de la phase de maturation de l'angiogenèse et l'inhibition des facteurs de quiescence pourraient être des pistes thérapeutiques pour le développement de nouvelles thérapies anti-angiogéniques.

9) Rôle de BMP9 dans la lymphangiogenèse.

Une étude récente montre qu'ALK1-Fc inhibe la lymphangiogenèse du derme de la queue de souris (Niessen K. 2010). L'inhibition de BMP9, par un anticorps anti-BMP9, pourrait aboutir aussi à un blocage de la lymphangiogenèse. Le rôle de BMP9 dans la lymphangiogenèse devra alors être étudié plus spécifiquement (régulateur de la voie Notch ? de la prolifération et/ou de la migration des cellules endothéliales lymphatiques ?,...).

10) Fonctions de BMP9 non vasculaires.

BMP9 semble jouer un rôle dans le développement du système nerveux central, l'ostéogenèse et la régulation du taux de glucose et du fer. Des études plus précises doivent être menées pour mieux connaître ces effets et déterminer le récepteur impliqué. S'il s'agit d'ALK1, ce serait le premier rôle d'ALK1 décrit, en dehors du système vasculaire.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ActR2	Activin Receptor type 2
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ALK	Activin receptor-Like Kinase
AMH	Hormone Anti-Müllerienne
AMHR2	AMH Receptor type 2
Ang	Angiopoïétine
AP1	Activator Protein 1
BAEC	Bovine Aortic Endothelial Cell
BAMBI	BMP and Activin Membrane Bound Protein
BH4	tétrahydrobiopterine 4
BISC	BMP Induced Signaling Complexe
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPER	BMP-binding Endothelial cell precursor-derived Regulator
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2
BRE	BMP Responsive Element
CamK2	Ca ²⁺ and calModulin-dependant Kinase 2
CBP	CREB Binding Protein
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
CEC	Cellule Endothéliale Circulante
cGKI	cGMP-dependant Kinase
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate
CHIP	C-terminus of Hsc70 Interacting Protein
CK2β	Casein Kinase 2β
CRM	Chromosome Region Maintenance
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
Dan	Differential screening-selected gene Aberrative in Neuroblastoma
Dll	Delta Like Ligand
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4
EMT	Transition épithélial-mésenchymateuse
Eng	Endogline
Erk	Extracellular-signal-Regulated Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLK	Fetal Liver Kinase
FLT	FMS-Like-Tyrosine kinase
FSH	Follicule Stimulating Hormone
GDF	Growth and Differentiation Factor
GDNF	Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GSK	Glycogen Synthase Kinase
hCG	Hormone Chorionique Gonadotrope
HDL	High Density Lipoproteins
HGS	Hepatocyte Growth factor-regulated tyrosine kinase Substrate
HHT	Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia
HIF	Hypoxia-Inducible Factor

HMVEC	Human MicroVascular Endothelial Cell
Hsp90	Heat Shock Protein 90
HTAP	HyperTension Artérielle Pulmonaire
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cell
IL	InterLeukine
I-Smad	Smad inhibitrice
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KLF6	Kruppel-Like Family 6
LAP	Latent Associated Protein
LH	Luteinizing Hormone
LTBP	Latent TGF- β binding protein
Mad	Mother Against dpp
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEEC	Mouse Embryonic Endothelial Cell
MESEC	Mouse Embryonic-Stem-cell-derived Endothelial Cell
MMP	MétalloProtéase Matricielle
MTMR4	Myotubularin-related protein 4
mTor	Mammalian Target of Rapamycin
NANDOR	NonActivating Non-DOWN-Regulating
NEC	Normal tissu Endothelial Cell
NES	Nuclear Export Sequence
NF κ B	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	Neural Growth Factor
NICD	Notch IntraCellular Domain
NLS	Nuclear Localising Sequence
Np	Neuropiline
Par-4	Prostate Apoptosis Response-4
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDK	Phosphoinositide Dependent Kinase
PDP	Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase
PEC	Progéniteur Endothélial Circulant
PFC	PreFormed receptor Complexe
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-phosphate Kinase
PI3P	Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate
PIP2	Phosphatidyl Inositol biPhosphate
PIGF	Placenta Growth Factor
RGM	Repulsive Guidance Molecule
R-Smad	Receptor-regulated Smad
RT	RétroTranscription
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SBE	Smad Binding Element
SCP	Small C-terminal domain Phosphatase
SGF	Sarcoma Growth Factor
SKR	Serine/threonine-Kinase Receptor
Smurf	SMad Ubiquitin Regulatory Factor
Sp1	Specificity Protein 1
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier protein
TAK	TGF- β -Activated Kinase

TEC	Tumor Endothelial Cell
TGF	Transforming Growth Factor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
Tsg	Twisted gastrulation
TSP	ThromboSPondine
TSR-1	TGF- β Superfamily Receptor-type 1
T β R2	TGF- β Receptor type 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Récepteur au VEGF
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPF	Vascular Permeability Factor

Bibliographie

Références bibliographiques

- Abdalla S. A., Pece-Barbara N., Vera S., Tapia E., Paez E., Bernabeu C. & Letarte M.** 2000. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9: 1227-1237.
- Abdalla S. A., Gallione C. J., Barst R. J., Horn E. M., Knowles J. A., Marchuk D. A., Letarte M. & Morse J. H.** 2004. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J* 23: 373-377.
- Abdollah S., Macias-Silva M., Tsukazaki T., Hayashi H., Attisano L. & Wrana J. L.** 1997. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272: 27678-27685.
- Abdollahi A., Hahnfeldt P., Maercker C., Grone H. J., Debus J., Ansorge W., Folkman J., Hlatky L. & Huber P. E.** 2004. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell* 13: 649-663.
- Abe K., Toba M., Alzoubi A., Ito M., Fagan K. A., Cool C. D., Voelkel N. F., McMurtry I. F. & Oka M.** 2010. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 121: 2747-2754.
- Adam P. J., Clesham G. J. & Weissberg P. L.** 1998. Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 33-37.
- Afrakhte M., Moren A., Jossan S., Itoh S., Sampath K., Westermarck B., Heldin C. H., Heldin N. E. & ten Dijke P.** 1998. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 505-511.
- Ainsworth N. L., Lee J. S. & Eisen T.** 2009. Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 9: 1793-1805.
- Aird W. C.** 2007a. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100: 174-190.
- Aird W. C.** 2007b. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100: 158-173.
- Albe E., Escalona E., Rajagopal R., Javier J. A., Chang J. H. & Azar D. T.** 2005. Proteomic identification of activin receptor-like kinase-1 as a differentially expressed protein during hyaloid vascular system regression. *FEBS Lett* 579: 5481-5486.
- Albinana V., Bernabeu-Herrero M. E., Zarrabeitia R., Bernabeu C. & Botella L. M.** 2010. Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 103: 525-534.
- Albinana V., Sanz-Rodriguez F., Recio-Poveda L., Bernabeu C. & Botella L. M.** 2011. Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor-beta1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 79: 833-843.
- Alden T. D., Beres E. J., Laurent J. S., Engh J. A., Das S., London S. D., Jane J. A., Jr., Hudson S. B. & Helm G. A.** 2000. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J Craniofac Surg* 11: 24-30.
- Alessandri G., Raju K. & Gullino P. M.** 1983. Mobilization of capillary endothelium *in vitro* induced by effectors of angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res* 43: 1790-1797.
- Allendorph G. P., Vale W. W. & Choe S.** 2006. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7643-7648.

Andrade S. P., Fan T. P. & Lewis G. P. 1987. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol* 68: 755-766.

Andrae J., Gallini R. & Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22: 1276-1312.

Annes J. P., Chen Y., Munger J. S. & Rifkin D. B. 2004. Integrin $\alpha V\beta 6$ -mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J Cell Biol* 165: 723-734.

Antoniades H. N., Scher C. D. & Stiles C. D. 1979. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1809-1813.

Anzano M. A., Roberts A. B., Meyers C. A., Komoriya A., Lamb L. C., Smith J. M. & Sporn M. B. 1982. Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res* 42: 4776-4778.

Aprelikova O., Pajusola K., Partanen J., Armstrong E., Alitalo R., Bailey S. K., McMahon J., Wasmuth J., Huebner K. & Alitalo K. 1992. FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Res* 52: 746-748.

Armstrong L. C. & Bornstein P. 2003. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 63-71.

Arthur H. M., Ure J., Smith A. J., Renforth G., Wilson D. I., Torsney E., Charlton R., Parums D. V., Jowett T., Marchuk D. A., Burn J. & Diamond A. G. 2000. Endoglin, an ancillary TGF β receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217: 42-53.

Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M. & Sporn M. B. 1983. Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258: 7155-7160.

Atkinson C., Stewart S., Upton P. D., Machado R., Thomson J. R., Trembath R. C. & Morrell N. W. 2002. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105: 1672-1678.

Attisano L., Carcamo J., Ventura F., Weis F. M., Massague J. & Wrana J. L. 1993. Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75: 671-680.

Attisano L., Wrana J. L., Montalvo E. & Massague J. 1996. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16: 1066-1073.

Auerbach R., Kubai L., Knighton D. & Folkman J. 1974. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol* 41: 391-394.

Auerbach R., Auerbach W. & Polakowski I. 1991. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther* 51: 1-11.

Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L. & Akhtar N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49: 32-40.

Ausprunk D. H., Knighton D. R. & Folkman J. 1974. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38: 237-248.

Ausprunk D. H., Knighton D. R. & Folkman J. 1975. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol* 79: 597-618.

Austin K. D. & Hall J. G. 1992. Nontraditional inheritance. *Pediatr Clin North Am* 39: 335-348.

Babitt J. L., Zhang Y., Samad T. A., Xia Y., Tang J., Campagna J. A., Schneyer A. L., Woolf C. J. & Lin H. Y. 2005. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280: 29820-29827.

- Babitt J. L., Huang F. W., Xia Y., Sidis Y., Andrews N. C. & Lin H. Y.** 2007. Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 117: 1933-1939.
- Bailly S., Dupuis-Girod S. & Plauchu H.** 2010. [Rendu-Osler disease: clinical and molecular update]. *Med Sci (Paris)* 26: 855-860.
- Barbara N. P., Wrana J. L. & Letarte M.** 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274: 584-594.
- Barcellos-Hoff M. H., Derynck R., Tsang M. L. & Weatherbee J. A.** 1994. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93: 892-899.
- Barcellos-Hoff M. H. & Dix T. A.** 1996. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 10: 1077-1083.
- Barrios-Rodiles M., Brown K. R., Ozdamar B., Bose R., Liu Z., Donovan R. S., Shinjo F., Liu Y., Dembowy J., Taylor I. W., Luga V., Przulj N., Robinson M., Suzuki H., Hayashizaki Y., Jurisica I. & Wrana J. L.** 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 307: 1621-1625.
- Bates D. O., Cui T. G., Doughty J. M., Winkler M., Sugiono M., Shields J. D., Peat D., Gillatt D. & Harper S. J.** 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131.
- Bauskin A. R., Zhang H. P., Fairlie W. D., He X. Y., Russell P. K., Moore A. G., Brown D. A., Stanley K. K. & Breit S. N.** 2000. The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *EMBO J* 19: 2212-2220.
- Bayrak-Toydemir P., McDonald J., Akarsu N., Toydemir R. M., Calderon F., Tuncali T., Tang W., Miller F. & Mao R.** 2006. A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* 140: 2155-2162.
- Beger B., Robertson K., Evans A., Grant A. & Berg J.** 2006. Expression of endoglin and the activin receptor-like kinase 1 in skin suggests a role for these receptors in normal skin function and skin tumorigenesis. *Br J Dermatol* 154: 379-382.
- Belik J., Jerkic M., McIntyre B. A., Pan J., Leen J., Yu L. X., Henkelman R. M., Toporsian M. & Letarte M.** 2009. Age-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling in pulmonary arteries of endoglin heterozygous mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1170-1178.
- Bellon T., Corbi A., Lastres P., Cales C., Cebrian M., Vera S., Cheifetz S., Massague J., Letarte M. & Bernabeu C.** 1993. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23: 2340-2345.
- Benchabane H. & Wrana J. L.** 2003. GATA- and Smad1-dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations. *Mol Cell Biol* 23: 6646-6661.
- Benedito R., Roca C., Sorensen I., Adams S., Gossler A., Fruttiger M. & Adams R. H.** 2009. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124-1135.
- Benjamin L. E., Hemo I. & Keshet E.** 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-1598.

Benjamin L. E., Golijanin D., Itin A., Pode D. & Keshet E. 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159-165.

Beppu H., Ichinose F., Kawai N., Jones R. C., Yu P. B., Zapol W. M., Miyazono K., Li E. & Bloch K. D. 2004. BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1241-1247.

Bergeron E., Marquis M. E., Chretien I. & Faucheux N. 2007. Differentiation of preosteoblasts using a delivery system with BMPs and bioactive glass microspheres. *J Mater Sci Mater Med* 18: 255-263.

Bernabeu C., Lopez-Novoa J. M. & Quintanilla M. 2009. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792: 954-973.

Best D. H., Vaughn C., McDonald J., Damjanovich K., Runo J. R., Chibuk J. M. & Bayrak-Toydemir P. 2011. Mosaic ACVRL1 and ENG mutations in hereditary haemorrhagic telangiectasia patients. *J Med Genet* 48: 358-360.

Bhowmick N. A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C. A., Engel M. E., Arteaga C. L. & Moses H. L. 2001a. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12: 27-36.

Bhowmick N. A., Zent R., Ghiassi M., McDonnell M. & Moses H. L. 2001b. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 276: 46707-46713.

Bibby M. C. 2004. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 40: 852-857.

Bidart M., Ricard N., Levet S., Samson M., Mallet C., David L., Subileau M., Tillet E., Feige J. J. & Bailly S. 2011. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*.

Bikfalvi A. 2004. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 30: 379-385.

Bikfalvi A. 2009. Modèles d'étude de l'angiogenèse. Pages 48-59 in Eurotext J. L., ed. *L'angiogenèse*.

Blanco F. J., Santibanez J. F., Guerrero-Esteo M., Langa C., Vary C. P. & Bernabeu C. 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 204: 574-584.

Blanco F. J., Grande M. T., Langa C., Oujo B., Velasco S., Rodriguez-Barbero A., Perez-Gomez E., Quintanilla M., Lopez-Novoa J. M. & Bernabeu C. 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103: 1383-1392.

Bonyadi M., Rusholme S. A., Cousins F. M., Su H. C., Biron C. A., Farrall M. & Akhurst R. J. 1997. Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF beta 1 knockout mice. *Nat Genet* 15: 207-211.

Bork P. & Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett* 300: 237-240.

Bostrom K. I., Jumabay M., Matveyenko A., Nicholas S. B. & Yao Y. 2011. Activation of vascular bone morphogenetic protein signaling in diabetes mellitus. *Circ Res* 108: 446-457.

Botella L. M., Sanchez-Elsner T., Rius C., Corbi A. & Bernabeu C. 2001. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 276: 34486-34494.

Botella L. M., Sanchez-Elsner T., Sanz-Rodriguez F., Kojima S., Shimada J., Guerrero-Esteo M., Cooreman M. P., Ratzu V., Langa C., Vary C. P., Ramirez J. R., Friedman S. & Bernabeu C. 2002. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100: 4001-4010.

Bourdeau A., Dumont D. J. & Letarte M. 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104: 1343-1351.

Brooks P. C., Clark R. A. & Cheresh D. A. 1994a. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science* 264: 569-571.

Brooks P. C., Montgomery A. M., Rosenfeld M., Reisfeld R. A., Hu T., Klier G. & Cheresh D. A. 1994b. Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.

Brown M. A., Zhao Q., Baker K. A., Naik C., Chen C., Pukac L., Singh M., Tsareva T., Parice Y., Mahoney A., Roschke V., Sanyal I. & Choe S. 2005. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* 280: 25111-25118.

Brown P. D., Wakefield L. M., Levinson A. D. & Sporn M. B. 1990. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3: 35-43.

Burrows F. J., Derbyshire E. J., Tazzari P. L., Amlot P., Gazdar A. F., King S. W., Letarte M., Vitetta E. S. & Thorpe P. E. 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1: 1623-1634.

Cacoub P., Dorent R., Maistre G., Nataf P., Carayon A., Piette C., Godeau P., Cabrol C. & Gandjbakhch I. 1993. Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol* 71: 448-450.

Calabro L., Fonsatti E., Bellomo G., Alonci A., Colizzi F., Sigalotti L., Altomonte M., Musolino C. & Maio M. 2003. Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 194: 171-175.

Caperuto L. C., Anhe G. F., Cambiaghi T. D., Akamine E. H., do Carmo Buonfiglio D., Cipolla-Neto J., Curi R. & Bordin S. 2008. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology* 149: 6326-6335.

Carcamo J., Weis F. M., Ventura F., Wieser R., Wrana J. L., Attisano L. & Massague J. 1994. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14: 3810-3821.

Carmeliet P., Mackman N., Moons L., Luther T., Gressens P., Van Vlaenderen I., Demunck H., Kasper M., Breier G., Evrard P., Muller M., Risau W., Edgington T. & Collen D. 1996. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383: 73-75.

Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.

Carmeliet P. & Tessier-Lavigne M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193-200.

Carmeliet P. & Jain R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473: 298-307.

Carpenter R. S., Goodrich L. R., Frisbie D. D., Kisiday J. D., Carbone B., McIlwraith C. W., Centeno C. J. & Hidaka C. 2010. Osteoblastic differentiation of human and equine adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells when BMP-2 or BMP-7

homodimer genetic modification is compared to BMP-2/7 heterodimer genetic modification in the presence and absence of dexamethasone. *J Orthop Res* 28: 1330-1337.

Carvalho R. L., Jonker L., Goumans M. J., Larsson J., Bouwman P., Karlsson S., Dijke P. T., Arthur H. M. & Mummery C. L. 2004. Defective paracrine signalling by TGF β in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development* 131: 6237-6247.

Castonguay R., Werner E. D., Matthews R. G., Presman E., Mulivor A. W., Solban N., Sako D., Pearsall R. S., Underwood K. W., Sehra J., Kumar R. & Grinberg A. V. 2011. Soluble endoglin specifically binds BMP9/BMP10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation and suppresses tumor growth. *J Biol Chem*.

Cate R. L., Mattaliano R. J., Hession C., Tizard R., Farber N. M., Cheung A., Ninfa E. G., Frey A. Z., Gash D. J., Chow E. P., Fisher R. A., Bertonis J. M., Torres G., Wallner B. P., Ramachandran K. L., Ragin R. C., Manganaro T. F., MacLaughlin D. T. & Donahoe P. K. 1986. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45: 685-698.

Celeste A. J., Song J. J., Cox K., Rosen V. & Wozney J. M. 1994. Bone morphogenetic protein-9, a new member of the TGF- β superfamily. *J Bone Min Res Suppl.* 1: S316.

Chacko B. M., Qin B., Correia J. J., Lam S. S., de Caestecker M. P. & Lin K. 2001. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol* 8: 248-253.

Chacko B. M., Qin B. Y., Tiwari A., Shi G., Lam S., Hayward L. J., De Caestecker M. & Lin K. 2004. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF- β signaling. *Mol Cell* 15: 813-823.

Chai J., Wu J. W., Yan N., Massague J., Pavletich N. P. & Shi Y. 2003. Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *J Biol Chem* 278: 20327-20331.

Chan M. C., Nguyen P. H., Davis B. N., Ohoka N., Hayashi H., Du K., Lagna G. & Hata A. 2007. A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* 27: 5776-5789.

Chang C., Eggen B. J., Weinstein D. C. & Brivanlou A. H. 2003. Regulation of nodal and BMP signaling by tomoregulin-1 (X7365) through novel mechanisms. *Dev Biol* 255: 1-11.

Chang H., Huylebroeck D., Verschuere K., Guo Q., Matzuk M. M. & Zwijsen A. 1999. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126: 1631-1642.

Chang H., Zwijsen A., Vogel H., Huylebroeck D. & Matzuk M. M. 2000. Smad5 is essential for left-right asymmetry in mice. *Dev Biol* 219: 71-78.

Chang H., Brown C. W. & Matzuk M. M. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev* 23: 787-823.

Chaouat A., Coulet F., Favre C., Simonneau G., Weitzenblum E., Soubrier F. & Humbert M. 2004. Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 59: 446-448.

Charng M. J., Frenkel P. A., Lin Q., Yamada M., Schwartz R. J., Olson E. N., Overbeek P. & Schneider M. D. 1998. A constitutive mutation of ALK5 disrupts cardiac looping and morphogenesis in mice. *Dev Biol* 199: 72-79.

Cheifetz S., Like B. & Massague J. 1986. Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 261: 9972-9978.

Cheifetz S., Weatherbee J. A., Tsang M. L., Anderson J. K., Mole J. E., Lucas R. & Massague J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415.

Cheifetz S., Andres J. L. & Massague J. 1988. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 263: 16984-16991.

Chen C., Grzegorzewski K. J., Barash S., Zhao Q., Schneider H., Wang Q., Singh M., Pukac L., Bell A. C., Duan R., Coleman T., Duttaroy A., Cheng S., Hirsch J., Zhang L., Lazard Y., Fischer C., Barber M. C., Ma Z. D., Zhang Y. Q., Reavey P., Zhong L., Teng B., Sanyal I., Ruben S. M., Blondel O. & Birse C. E. 2003. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol* 21: 294-301.

Chen C. L., Huang S. S. & Huang J. S. 2006. Cellular heparan sulfate negatively modulates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) responsiveness in epithelial cells. *J Biol Chem* 281: 11506-11514.

Chen C. Z., Li M., de Graaf D., Monti S., Gottgens B., Sanchez M. J., Lander E. S., Golub T. R., Green A. R. & Lodish H. F. 2002. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15468-15473.

Chen H., Shi S., Acosta L., Li W., Lu J., Bao S., Chen Z., Yang Z., Schneider M. D., Chien K. R., Conway S. J., Yoder M. C., Haneline L. S., Franco D. & Shou W. 2004. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development* 131: 2219-2231.

Chen H., Yong W., Ren S., Shen W., He Y., Cox K. A., Zhu W., Li W., Soonpaa M., Payne R. M., Franco D., Field L. J., Rosen V., Wang Y. & Shou W. 2006. Overexpression of bone morphogenetic protein 10 in myocardium disrupts cardiac postnatal hypertrophic growth. *J Biol Chem* 281: 27481-27491.

Chen H. B., Rud J. G., Lin K. & Xu L. 2005. Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J Biol Chem* 280: 21329-21336.

Chen H. B., Shen J., Ip Y. T. & Xu L. 2006. Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* 20: 648-653.

Chen X., Weisberg E., Fridmacher V., Watanabe M., Naco G. & Whitman M. 1997. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389: 85-89.

Chen Y. G., Liu F. & Massague J. 1997. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16: 3866-3876.

Chen Y. G., Hata A., Lo R. S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N. & Massague J. 1998. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12: 2144-2152.

Chen Y. G., Wang Z., Ma J., Zhang L. & Lu Z. 2007. Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 282: 9688-9695.

Cirulli A., Liso A., D'Ovidio F., Mestice A., Pasculli G., Gallitelli M., Rizzi R., Specchia G. & Sabba C. 2003. Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematol* 110: 29-32.

Cleaver O. & Melton D. A. 2003. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9: 661-668.

Cole S. G., Begbie M. E., Wallace G. M. & Shovlin C. L. 2005. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 42: 577-582.

Compton L. A., Potash D. A., Brown C. B. & Barnett J. V. 2007. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ Res* 101: 784-791.

Conery A. R., Cao Y., Thompson E. A., Townsend C. M., Jr., Ko T. C. & Luo K. 2004. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 6: 366-372.

Conley C. A., Silburn R., Singer M. A., Ralston A., Rohwer-Nutter D., Olson D. J., Gelbart W. & Blair S. S. 2000. Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in *Drosophila*. *Development* 127: 3947-3959.

Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M. & Feder J. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478.

Connolly S. E., Hores T. A., Smith L. E. & D'Amore P. A. 1988. Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc Res* 36: 275-290.

Constam D. B. & Robertson E. J. 1999. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* 144: 139-149.

Corti P., Young S., Chen C. Y., Patrick M. J., Rochon E. R., Pekkan K. & Roman B. L. 2011. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Development* 138: 1573-1582.

Coultas L., Chawengsaksophak K. & Rossant J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438: 937-945.

Cudmore M., Ahmad S., Al-Ani B., Fujisawa T., Coxall H., Chudasama K., Devey L. R., Wigmore S. J., Abbas A., Hewett P. W. & Ahmed A. 2007. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation* 115: 1789-1797.

Cunha S. I., Pardali E., Thorikay M., Anderberg C., Hawinkels L., Goumans M. J., Seehra J., Heldin C. H., ten Dijke P. & Pietras K. 2010. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J Exp Med* 207: 85-100.

Cymerman U., Vera S., Pece-Barbara N., Bourdeau A., White R. I., Jr., Dunn J. & Letarte M. 2000. Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 47: 24-35.

D'Alonzo G. E., Barst R. J., Ayres S. M., Bergofsky E. H., Brundage B. H., Detre K. M., Fishman A. P., Goldring R. M., Groves B. M., Kernis J. T., Levy P. S., Pietra G. G., Reid L. M., Reeves J. T., Rich S., Vreim C. E., Williams G. W. & Wu M. 1991. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115: 343-349.

D'Amore P. A. & Smith S. R. 1993. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors* 8: 61-75.

Daopin S., Piez K. A., Ogawa Y. & Davies D. R. 1992. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257: 369-373.

Darland D. C. & D'Amore P. A. 2001. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. *Angiogenesis* 4: 11-20.

David L., Mallet C., Mazerbourg S., Feige J. J. & Bailly S. 2007a. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109: 1953-1961.

David L., Mallet C., Vailhe B., Lamouille S., Feige J. J. & Bailly S. 2007b. Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J Cell Physiol* 213: 484-489.

David L., Mallet C., Keramidas M., Lamande N., Gasc J. M., Dupuis-Girod S., Plauchu H., Feige J. J. & Bailly S. 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res* 102: 914-922.

Davis B. N., Hilyard A. C., Lagna G. & Hata A. 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454: 56-61.

Davis B. N., Hilyard A. C., Nguyen P. H., Lagna G. & Hata A. 2010. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell* 39: 373-384.

Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C. & Yancopoulos G. D. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169.

Dawson D. W., Pearce S. F., Zhong R., Silverstein R. L., Frazier W. A. & Bouck N. P. 1997. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138: 707-717.

de Jesus Perez V. A., Alastalo T. P., Wu J. C., Axelrod J. D., Cooke J. P., Amieva M. & Rabinovitch M. 2009. Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol* 184: 83-99.

de Larco J. E. & Todaro G. J. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4001-4005.

de Martin R., Haendler B., Hofer-Warbinek R., Gaugitsch H., Wrann M., Schlusener H., Seifert J. M., Bodmer S., Fontana A. & Hofer E. 1987. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. *EMBO J* 6: 3673-3677.

de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N. & Williams L. T. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991.

del Toro R., Prahst C., Mathivet T., Siegfried G., Kaminker J. S., Larrivee B., Breant C., Duarte A., Takakura N., Fukamizu A., Penninger J. & Eichmann A. 2010. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116: 4025-4033.

Delot E. C., Bahamonde M. E., Zhao M. & Lyons K. M. 2003. BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development* 130: 209-220.

Deng Z., Morse J. H., Slager S. L., Cuervo N., Moore K. J., Venetos G., Kalachikov S., Cayanis E., Fischer S. G., Barst R. J., Hodge S. E. & Knowles J. A. 2000. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* 67: 737-744.

Derynck R., Jarrett J. A., Chen E. Y., Eaton D. H., Bell J. R., Assoian R. K., Roberts A. B., Sporn M. B. & Goeddel D. V. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-705.

Dhanabal M., Ramchandran R., Waterman M. J., Lu H., Knebelmann B., Segal M. & Sukhatme V. P. 1999. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 274: 11721-11726.

di Clemente N., Jamin S. P., Lugovskoy A., Carmillo P., Ehrenfels C., Picard J. Y., Whitty A., Josso N., Pepinsky R. B. & Cate R. L. 2010. Processing of anti-mullerian

hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-beta. *Mol Endocrinol* 24: 2193-2206.

Di Guglielmo G. M., Le Roy C., Goodfellow A. F. & Wrana J. L. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5: 410-421.

Dickson M. C., Martin J. S., Cousins F. M., Kulkarni A. B., Karlsson S. & Akhurst R. J. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854.

Dimmeler S., Dernbach E. & Zeiher A. M. 2000. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262.

Dorai H., Vukicevic S. & Sampath T. K. 2000. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype *in vitro*. *J Cell Physiol* 184: 37-45.

Dorfmüller P., Perros F., Balabanian K. & Humbert M. 2003. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 22: 358-363.

Duan X., Liang Y. Y., Feng X. H. & Lin X. 2006. Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 281: 36526-36532.

Dubois C. M., Laprise M. H., Blanchette F., Gentry L. E. & Leduc R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270: 10618-10624.

Dudley A. T., Lyons K. M. & Robertson E. J. 1995. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795-2807.

Duff S. E., Li C., Garland J. M. & Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* 17: 984-992.

Dupuis-Girod S., Bailly S. & Plauchu H. 2010. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology to patient care. *J Thromb Haemost* 8: 1447-1456.

Eddahibi S., Humbert M., Fadel E., Raffestin B., Darmon M., Capron F., Simonneau G., Darteville P., Hamon M. & Adnot S. 2001. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 108: 1141-1150.

Eddahibi S., Guignabert C., Barlier-Mur A. M., Dewachter L., Fadel E., Darteville P., Humbert M., Simonneau G., Hanoun N., Saurini F., Hamon M. & Adnot S. 2006. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113: 1857-1864.

Edlund S., Landstrom M., Heldin C. H. & Aspenstrom P. 2002. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* 13: 902-914.

Ehrlich M., Horbelt D., Marom B., Knaus P. & Henis Y. I. 2011. Homomeric and heteromeric complexes among TGF-beta and BMP receptors and their roles in signaling. *Cell Signal* 23: 1424-1432.

Eikesdal H. P. & Kalluri R. 2009. Drug resistance associated with antiangiogenesis therapy. *Semin Cancer Biol* 19: 310-317.

Ekker S. C. 2000. Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 17: 302-306.

El-Bizri N., Guignabert C., Wang L., Cheng A., Stankunas K., Chang C. P., Mishina Y. & Rabinovitch M. 2008. SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic

protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development* 135: 2981-2991.

El-Harith el H. A., Kuhnau W., Schmidtke J., Gadzicki D., Ahmed M., Krawczak M. & Stuhmann M. 2006. Hereditary hemorrhagic telangiectasia is caused by the Q490X mutation of the ACVRL1 gene in a large Arab family: support of homozygous lethality. *Eur J Med Genet* 49: 323-330.

Eliceiri B. P. & Cheresh D. A. 1998. The role of alphav integrins during angiogenesis. *Mol Med* 4: 741-750.

Eliceiri B. P., Paul R., Schwartzberg P. L., Hood J. D., Leng J. & Cheresh D. A. 1999. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4: 915-924.

Engel M. E., McDonnell M. A., Law B. K. & Moses H. L. 1999. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 274: 37413-37420.

Esser S., Lampugnani M. G., Corada M., Dejana E. & Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13): 1853-1865.

Eyries M., Coulet F., Girerd B., Montani D., Humbert M., Lacombe P., Chinet T., Gouya L., Roume J., Axford M. M., Pearson C. E. & Soubrier F. 2011. ACVRL1 germinal mosaic with two mutant alleles in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia associated with Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Genet*.

Fairlie W. D., Zhang H. P., Wu W. M., Pankhurst S. L., Bauskin A. R., Russell P. K., Brown P. K. & Breit S. N. 2001. The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J Biol Chem* 276: 16911-16918.

Fantin A., Vieira J. M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhodzij S., Peri F., Wilson S. W. & Ruhrberg C. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116: 829-840.

Feige J. J. 2009. Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et leurs récepteurs. Pages 1-17 in Eurotext J. L., ed. *L'angiogenèse*.

Felici A., Wurthner J. U., Parks W. T., Giam L. R., Reiss M., Karpova T. S., McNally J. G. & Roberts A. B. 2003. TLP, a novel modulator of TGF-beta signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signaling. *EMBO J* 22: 4465-4477.

Feng X. H. & Derynck R. 1997. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* 16: 3912-3923.

Fernandez L. A., Sanz-Rodriguez F., Zarrabeitia R., Perez-Molino A., Morales C., Restrepo C. M., Ramirez J. R., Coto E., Lenato G. M., Bernabeu C. & Botella L. M. 2006. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* 27: 295.

Ferrara N. & Henzel W. J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858.

Ferrara N., Clapp C. & Weiner R. 1991. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129: 896-900.

Ferrara N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543.

Ferrara N., Hillan K. J., Gerber H. P. & Novotny W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3: 391-400.

Ferrara N. & Kerbel R. S. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-974.

Fiedler U. & Augustin H. G. 2006. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 27: 552-558.

Figg W. D., Dahut W., Duray P., Hamilton M., Tompkins A., Steinberg S. M., Jones E., Premkumar A., Linehan W. M., Floeter M. K., Chen C. C., Dixon S., Kohler D. R., Kruger E. A., Gubish E., Pluda J. M. & Reed E. 2001. A randomized phase II trial of thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 7: 1888-1893.

Finnson K. W., Parker W. L., ten Dijke P., Thorikay M. & Philip A. 2008. ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* 23: 896-906.

Flieger D., Hainke S. & Fischbach W. 2006. Dramatic improvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia after treatment with the vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist bevacizumab. *Ann Hematol* 85: 631-632.

Foletta V. C., Lim M. A., Soosairajah J., Kelly A. P., Stanley E. G., Shannon M., He W., Das S., Massague J. & Bernard O. 2003. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 162: 1089-1098.

Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186.

Folkman J., Hahnfelddt P. & Hlatky L. 2000. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 76-79.

Frey R. S. & Mulder K. M. 1997a. Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res* 57: 628-633.

Frey R. S. & Mulder K. M. 1997b. TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 117: 41-50.

Frolik C. A., Dart L. L., Meyers C. A., Smith D. M. & Sporn M. B. 1983. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3676-3680.

Frolik C. A., Wakefield L. M., Smith D. M. & Sporn M. B. 1984. Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 259: 10995-11000.

Fruttiger M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10: 77-88.

Fuentealba L. C., Eivers E., Ikeda A., Hurtado C., Kuroda H., Pera E. M. & De Robertis E. M. 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131: 980-993.

Fujii M., Takeda K., Imamura T., Aoki H., Sampath T. K., Enomoto S., Kawabata M., Kato M., Ichijo H. & Miyazono K. 1999. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10: 3801-3813.

Fujiwara M., Yagi H., Matsuoka R., Akimoto K., Furutani M., Imamura S., Uehara R., Nakayama T., Takao A., Nakazawa M. & Saji T. 2008. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMPR2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 72: 127-133.

Fuller T., Korff T., Kilian A., Dandekar G. & Augustin H. G. 2003. Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells. *J Cell Sci* 116: 2461-2470.

Furuhashi M., Yagi K., Yamamoto H., Furukawa Y., Shimada S., Nakamura Y., Kikuchi A., Miyazono K. & Kato M. 2001. Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21: 5132-5141.

Gale N. W. & Yancopoulos G. D. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13: 1055-1066.

Gallione C. J., Klaus D. J., Yeh E. Y., Stenzel T. T., Xue Y., Anthony K. B., McAllister K. A., Baldwin M. A., Berg J. N., Lux A., Smith J. D., Vary C. P., Craigen W. J., Westermann C. J., Warner M. L., Miller Y. E., Jackson C. E., Guttmacher A. E. & Marchuk D. A. 1998. Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat* 11: 286-294.

Gallione C. J., Richards J. A., Letteboer T. G., Rushlow D., Prigoda N. L., Leedom T. P., Ganguly A., Castells A., Ploos van Amstel J. K., Westermann C. J., Pyeritz R. E. & Marchuk D. A. 2006. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* 43: 793-797.

Galvin K. M., Donovan M. J., Lynch C. A., Meyer R. I., Paul R. J., Lorenz J. N., Fairchild-Huntress V., Dixon K. L., Dunmore J. H., Gimbrone M. A., Jr., Falb D. & Huszar D. 2000. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 24: 171-174.

Gao L., Joberty G. & Macara I. G. 2002. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol* 12: 221-225.

Garamszegi N., Dore J. J., Jr., Penheiter S. G., Edens M., Yao D. & Leof E. B. 2001. Transforming growth factor beta receptor signaling and endocytosis are linked through a COOH terminal activation motif in the type I receptor. *Mol Biol Cell* 12: 2881-2893.

Garcia-Tsao G. 2007. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *J Hepatol* 46: 499-507.

Gariano R. F. & Gardner T. W. 2005. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438: 960-966.

Garrido-Martin E. M., Blanco F. J., Fernandez L. A., Langa C., Vary C. P., Lee U. E., Friedman S. L., Botella L. M. & Bernabeu C. 2010. Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol* 11: 51.

Gatenby R. A. & Gillies R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-899.

Gaussin V., Van de Putte T., Mishina Y., Hanks M. C., Zwijsen A., Huylebroeck D., Behringer R. R. & Schneider M. D. 2002. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2878-2883.

Ge G., Hopkins D. R., Ho W. B. & Greenspan D. S. 2005. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 25: 5846-5858.

Gentry L. E. & Nash B. W. 1990. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 29: 6851-6857.

Gerber H. P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B. A., Dixit V. & Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival

through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273: 30336-30343.

Gerety S. S., Wang H. U., Chen Z. F. & Anderson D. J. 1999. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4: 403-414.

Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D. & Betsholtz C. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163-1177.

Giaid A. & Saleh D. 1995. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333: 214-221.

Gilboa L., Wells R. G., Lodish H. F. & Henis Y. I. 1998. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* 140: 767-777.

Gilboa L., Nohe A., Geissendorfer T., Sebald W., Henis Y. I. & Knaus P. 2000. Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11: 1023-1035.

Gimbrone M. A., Jr., Cotran R. S., Leapman S. B. & Folkman J. 1974. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413-427.

Girerd B., Montani D., Coulet F., Sztrymf B., Yaici A., Jais X., Tregouet D., Reis A., Drouin-Garraud V., Fraisse A., Sitbon O., O'Callaghan D. S., Simonneau G., Soubrier F. & Humbert M. 2010. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 851-861.

Gleizes P. E., Beavis R. C., Mazzieri R., Shen B. & Rifkin D. B. 1996. Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 271: 29891-29896.

Gleizes P. E., Munger J. S., Nunes I., Harpel J. G., Mazzieri R., Noguera I. & Rifkin D. B. 1997. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* 15: 190-197.

Glister C., Kemp C. F. & Knight P. G. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127: 239-254.

Gomis R. R., Alarcon C., He W., Wang Q., Seoane J., Lash A. & Massague J. 2006. A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12747-12752.

Good D. J., Polverini P. J., Rastinejad F., Le Beau M. M., Lemons R. S., Frazier W. A. & Bouck N. P. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6624-6628.

Gospodarowicz D., Abraham J. A. & Schilling J. 1989. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7311-7315.

Gougos A. & Letarte M. 1988. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141: 1925-1933.

Gougos A. & Letarte M. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361-8364.

Gougos A., St Jacques S., Greaves A., O'Connell P. J., d'Apice A. J., Buhring H. J., Bernabeu C., van Mourik J. A. & Letarte M. 1992. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* 4: 83-92.

Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P. & ten Dijke P. 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21: 1743-1753.

Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Lebrin F., Larsson J., Mummery C., Karlsson S. & ten Dijke P. 2003. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12: 817-828.

Govani F. S. & Shovlin C. L. 2009. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 17: 860-871.

Govani F. S. & Shovlin C. L. 2010. Fine mapping of the hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT)3 locus on chromosome 5 excludes VE-Cadherin-2, Sprouty4 and other interval genes. *J Angiogenesis Res* 2: 15.

Grant D. S., Kinsella J. L., Fridman R., Auerbach R., Piasecki B. A., Yamada Y., Zain M. & Kleinman H. K. 1992. Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) *in vitro* and induction of angiogenic behavior *in vivo*. *J Cell Physiol* 153: 614-625.

Gray A. M. & Mason A. J. 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247: 1328-1330.

Gray P. C., Harrison C. A. & Vale W. 2003. Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5193-5198.

Gray P. C., Shani G., Aung K., Kelber J. & Vale W. 2006. Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGF-beta signaling. *Mol Cell Biol* 26: 9268-9278.

Greenwald J., Groppe J., Gray P., Wiater E., Kwiatkowski W., Vale W. & Choe S. 2003. The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell* 11: 605-617.

Greenwald J., Vega M. E., Allendorph G. P., Fischer W. H., Vale W. & Choe S. 2004. A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell* 15: 485-489.

Gritsman K., Zhang J., Cheng S., Heckscher E., Talbot W. S. & Schier A. F. 1999. The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97: 121-132.

Gronroos E., Hellman U., Heldin C. H. & Ericsson J. 2002. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 10: 483-493.

Groppe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J., Economides A. N., Kwiatkowski W., Affolter M., Vale W. W., Belmonte J. C. & Choe S. 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420: 636-642.

Groppe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J., Economides A. N., Kwiatkowski W., Baban K., Affolter M., Vale W. W., Izipisua Belmonte J. C. & Choe S. 2003. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3: 52-58.

Groppe J., Hinck C. S., Samavarchi-Tehrani P., Zubieta C., Schuermann J. P., Taylor A. B., Schwarz P. M., Wrana J. L. & Hinck A. P. 2008. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell* 29: 157-168.

- Gu Y., Jin P., Zhang L., Zhao X., Gao X., Ning Y., Meng A. & Chen Y. G.** 2006. Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-beta receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood* 107: 1951-1954.
- Guerrero-Esteo M., Sanchez-Elsner T., Letamendia A. & Bernabeu C.** 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277: 29197-29209.
- Guo B., Slevin M., Li C., Parameshwar S., Liu D., Kumar P., Bernabeu C. & Kumar S.** 2004. CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* 24: 1337-1345.
- Guo X., Ramirez A., Waddell D. S., Li Z., Liu X. & Wang X. F.** 2008. Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. *Genes Dev* 22: 106-120.
- Guttmacher A. E., Marchuk D. A. & White R. I., Jr.** 1995. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333: 918-924.
- Haglund K. & Dikic I.** 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24: 3353-3359.
- Hahn S. A., Schutte M., Hoque A. T., Moskaluk C. A., da Costa L. T., Rozenblum E., Weinstein C. L., Fischer A., Yeo C. J., Hruban R. H. & Kern S. E.** 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
- Halbrooks P. J., Ding R., Wozney J. M. & Bain G.** 2007. Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal* 2: 4.
- Hamano Y. & Kalluri R.** 2005. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 292-298.
- Hanafusa H., Ninomiya-Tsuji J., Masuyama N., Nishita M., Fujisawa J., Shibuya H., Matsumoto K. & Nishida E.** 1999. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274: 27161-27167.
- Hanai J., Dhanabal M., Karumanchi S. A., Albanese C., Waterman M., Chan B., Ramchandran R., Pestell R. & Sukhatme V. P.** 2002. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 277: 16464-16469.
- Hao Q., Su H., Marchuk D. A., Rola R., Wang Y., Liu W., Young W. L. & Yang G. Y.** 2008. Increased tissue perfusion promotes capillary dysplasia in the ALK1-deficient mouse brain following VEGF stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2250-2256.
- Hao Q., Zhu Y., Su H., Shen F., Yang G. Y., Kim H. & Young W. L.** 2010. VEGF Induces More Severe Cerebrovascular Dysplasia in Endoglin than in Alk1 Mice. *Transl Stroke Res* 1: 197-201.
- Harms P. W. & Chang C.** 2003. Tomoregulin-1 (TMEFF1) inhibits nodal signaling through direct binding to the nodal coreceptor Cripto. *Genes Dev* 17: 2624-2629.
- Harrington A. E., Morris-Triggs S. A., Ruotolo B. T., Robinson C. V., Ohnuma S. & Hyvonen M.** 2006. Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *EMBO J* 25: 1035-1045.
- Harrington L. S., Sainson R. C., Williams C. K., Taylor J. M., Shi W., Li J. L. & Harris A. L.** 2008. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 75: 144-154.
- Harrison C. A., Wiater E., Gray P. C., Greenwald J., Choe S. & Vale W.** 2004. Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 225: 19-24.

Harrison R. E., Flanagan J. A., Sankelo M., Abdalla S. A., Rowell J., Machado R. D., Elliott C. G., Robbins I. M., Olschewski H., McLaughlin V., Gruenig E., Kermeen F., Halme M., Raisanen-Sokolowski A., Laitinen T., Morrell N. W. & Trembath R. C. 2003. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 40: 865-871.

Harrison R. E., Berger R., Haworth S. G., Tulloh R., Mache C. J., Morrell N. W., Aldred M. A. & Trembath R. C. 2005. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation* 111: 435-441.

Hart P. J., Deep S., Taylor A. B., Shu Z. Y., Hinck C. S. & Hinck A. P. 2002. Crystal structure of the human T beta R2 ectodomain-TGF-beta 3 complex. *Nature Structural Biology* 9: 203-208.

Hartsough M. T. & Mulder K. M. 1995. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 270: 7117-7124.

Hartung A., Bitton-Worms K., Rechtman M. M., Wenzel V., Boergermann J. H., Hassel S., Henis Y. I. & Knaus P. 2006. Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* 26: 7791-7805.

Hata A., Lo R. S., Wotton D., Lagna G. & Massague J. 1997. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388: 82-87.

Hata A., Lagna G., Massague J. & Hemmati-Brivanlou A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12: 186-197.

Hawinkels L. J., Kuiper P., Wiercinska E., Verspaget H. W., Liu Z., Pardali E., Sier C. F. & ten Dijke P. 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70: 4141-4150.

Hayashi H., Abdollah S., Qiu Y., Cai J., Xu Y. Y., Grinnell B. W., Richardson M. A., Topper J. N., Gimbrone M. A., Jr., Wrana J. L. & Falb D. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89: 1165-1173.

Hayashida T., Decaestecker M. & Schnaper H. W. 2003. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *FASEB J* 17: 1576-1578.

Hayes S., Chawla A. & Corvera S. 2002. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* 158: 1239-1249.

He W. W., Gustafson M. L., Hirobe S. & Donahoe P. K. 1993. Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor-beta type II receptor family. *Dev Dyn* 196: 133-142.

Heinecke K., Seher A., Schmitz W., Mueller T. D., Sebald W. & Nickel J. 2009. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol* 7: 59.

Heinl-Green A., Radke P. W., Munkonge F. M., Frass O., Zhu J., Vincent K., Geddes D. M. & Alton E. W. 2005. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 26: 1327-1332.

Hellstrom M., Kalen M., Lindahl P., Abramsson A. & Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047-3055.

Hellstrom M., Gerhardt H., Kalen M., Li X., Eriksson U., Wolburg H. & Betsholtz C. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153: 543-553.

Hellstrom M., Phng L. K., Hofmann J. J., Wallgard E., Coultas L., Lindblom P., Alva J., Nilsson A. K., Karlsson L., Gaiano N., Yoon K., Rossant J., Iruela-Arispe M. L.,

Kalen M., Gerhardt H. & Betsholtz C. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445: 776-780.

Helm G. A., Alden T. D., Beres E. J., Hudson S. B., Das S., Engh J. A., Pittman D. D., Kerns K. M. & Kallmes D. F. 2000. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J Neurosurg* 92: 191-196.

Henis Y. I., Moustakas A., Lin H. Y. & Lodish H. F. 1994. The types II and III transforming growth factor-beta receptors form homo-oligomers. *J Cell Biol* 126: 139-154.

Henry T. D., Annex B. H., McKendall G. R., Azrin M. A., Lopez J. J., Giordano F. J., Shah P. K., Willerson J. T., Benza R. L., Berman D. S., Gibson C. M., Bajamonde A., Rundle A. C., Fine J. & McCluskey E. R. 2003. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107: 1359-1365.

Herrera B., van Dinther M., Ten Dijke P. & Inman G. J. 2009. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res* 69: 9254-9262.

Herzog Y., Guttmann-Raviv N. & Neufeld G. 2005. Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev Dyn* 232: 1047-1055.

Hills R. L., Belanger L. M. & Morris E. A. 2005. Bone morphogenetic protein 9 is a potent anabolic factor for juvenile bovine cartilage, but not adult cartilage. *J Orthop Res* 23: 611-617.

Hinck A. P., Archer S. J., Qian S. W., Roberts A. B., Sporn M. B., Weatherbee J. A., Tsang M. L., Lucas R., Zhang B. L., Wenker J. & Torchia D. A. 1996. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* 35: 8517-8534.

Hirschi K. K., Rohovsky S. A. & D'Amore P. A. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 141: 805-814.

Hocevar B. A., Brown T. L. & Howe P. H. 1999. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 18: 1345-1356.

Hocevar B. A., Smine A., Xu X. X. & Howe P. H. 2001. The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J* 20: 2789-2801.

Hoeper M. M., Galie N., Simonneau G. & Rubin L. J. 2002. New treatments for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1209-1216.

Holash J., Maisonpierre P. C., Compton D., Boland P., Alexander C. R., Zagzag D., Yancopoulos G. D. & Wiegand S. J. 1999. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284: 1994-1998.

Holley R. W. 1975. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258: 487-490.

Hong K. H., Lee Y. J., Lee E., Park S. O., Han C., Beppu H., Li E., Raizada M. K., Bloch K. D. & Oh S. P. 2008. Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 118: 722-730.

Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winer J. & Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031-26037.

Hsu D. R., Economides A. N., Wang X., Eimon P. M. & Harland R. M. 1998. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1: 673-683.

Hu-Lowe D. D., Chen E., Zhang L., Watson K. D., Mancuso P., Lappin P., Wickman G., Chen J. H., Wang J., Jiang X., Amundson K., Simon R., Erbersdobler A., Bergqvist S., Feng Z., Swanson T. A., Simmons B. H., Lippincott J., Casperson G. F., Levin W. J., Stampino C. G., Shalinsky D. R., Ferrara K. W., Fiedler W. & Bertolini F. 2011. Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res* 71: 1362-1373.

Huang T., David L., Mendoza V., Yang Y., Villarreal M., De K., Sun L., Fang X., Lopez-Casillas F., Wrana J. L. & Hinck A. P. 2011. TGF-beta signalling is mediated by two autonomously functioning TbetaRI:TbetaRII pairs. *EMBO J* 30: 1263-1276.

Huang Z., Wang D., Ihida-Stansbury K., Jones P. L. & Martin J. F. 2009. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* 18: 2791-2801.

Humbert M., Sitbon O. & Simonneau G. 2004. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351: 1425-1436.

Humbert M., Sitbon O., Chaouat A., Bertocchi M., Habib G., Gressin V., Yaici A., Weitzenblum E., Cordier J. F., Chabot F., Dromer C., Pison C., Reynaud-Gaubert M., Haloun A., Laurent M., Hachulla E. & Simonneau G. 2006. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1023-1030.

Huse M., Chen Y. G., Massague J. & Kuriyan J. 1999. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96: 425-436.

Huse M., Muir T. W., Xu L., Chen Y. G., Kuriyan J. & Massague J. 2001. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* 8: 671-682.

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata M. & Miyazono K. 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389: 622-626.

Inman G. J. & Hill C. S. 2002a. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem* 277: 51008-51016.

Inman G. J., Nicolas F. J. & Hill C. S. 2002b. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 10: 283-294.

Inoue Y., Itoh Y., Abe K., Okamoto T., Daitoku H., Fukamizu A., Onozaki K. & Hayashi H. 2007. Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene* 26: 500-508.

Ishida W., Hamamoto T., Kusanagi K., Yagi K., Kawabata M., Takehara K., Sampath T. K., Kato M. & Miyazono K. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275: 6075-6079.

Ishisaki A., Yamato K., Nakao A., Nonaka K., Ohguchi M., ten Dijke P. & Nishihara T. 1998. Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 273: 24293-24296.

Israel D. I., Nove J., Kerns K. M., Moutsatsos I. K. & Kaufman R. J. 1992. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7: 139-150.

Israel D. I., Nove J., Kerns K. M., Kaufman R. J., Rosen V., Cox K. A. & Wozney J. M. 1996. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors* 13: 291-300.

Ito T., Williams J. D., Fraser D. J. & Phillips A. O. 2004. Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization. *J Biol Chem* 279: 25326-25332.

Itoh S., Landstrom M., Hermansson A., Itoh F., Heldin C. H., Heldin N. E. & ten Dijke P. 1998. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 273: 29195-29201.

Jackson C. J. & Nguyen M. 1997. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1167-1177.

Jadrich J. L., O'Connor M. B. & Coucouvanis E. 2006. The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development *in vivo*. *Development* 133: 1529-1541.

Jain R. K. 2001. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7: 987-989.

Jain R. K. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62.

Jakobsson L., Franco C. A., Bentley K., Collins R. T., Ponsioen B., Aspalter I. M., Rosewell I., Busse M., Thurston G., Medvinsky A., Schulte-Merker S. & Gerhardt H. 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 12: 943-953.

Jakowlew S. B., Dillard P. J., Kondaiah P., Sporn M. B. & Roberts A. B. 1988a. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor-beta messenger ribonucleic acid from chick embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 2: 747-755.

Jakowlew S. B., Dillard P. J., Sporn M. B. & Roberts A. B. 1988b. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 2: 1186-1195.

Jaskolka J., Wu L., Chan R. P. & Faughnan M. E. 2004. Imaging of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *AJR Am J Roentgenol* 183: 307-314.

Jayaraman L. & Massague J. 2000. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 275: 40710-40717.

Jerkic M., Rivas-Elena J. V., Prieto M., Carron R., Sanz-Rodriguez F., Perez-Barriocanal F., Rodriguez-Barbero A., Bernabeu C. & Lopez-Novoa J. M. 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J* 18: 609-611.

Jerkic M., Rodriguez-Barbero A., Prieto M., Toporsian M., Pericacho M., Rivas-Elena J. V., Obreo J., Wang A., Perez-Barriocanal F., Arevalo M., Bernabeu C., Letarte M. & Lopez-Novoa J. M. 2006. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69: 845-854.

Jiao K., Kulesa H., Tompkins K., Zhou Y., Batts L., Baldwin H. S. & Hogan B. L. 2003. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev* 17: 2362-2367.

Jimenez B., Volpert O. V., Crawford S. E., Febbraio M., Silverstein R. L. & Bouck N. 2000. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6: 41-48.

Johnson D. W., Berg J. N., Baldwin M. A., Gallione C. J., Marondel I., Yoon S. J., Stenzel T. T., Speer M., Pericak-Vance M. A., Diamond A., Guttmacher A. E., Jackson C. E., Attisano L., Kucherlapati R., Porteous M. E. & Marchuk D. A. 1996. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13: 189-195.

Johnson S. R., Granton J. T. & Mehta S. 2006. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* 130: 545-552.

- Jones W. K., Richmond E. A., White K., Sasak H., Kusmik W., Smart J., Oppermann H., Rueger D. C. & Tucker R. F.** 1994. Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors* 11: 215-225.
- Jonker L. & Arthur H. M.** 2002. Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mech Dev* 110: 193-196.
- Jost A.** 1953. Problems of Fetal Endocrinology - the Gonadal and Hypophyseal Hormones. *Recent Progress in Hormone Research* 8: 379-418.
- Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N. & Alitalo K.** 1996. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15: 1751.
- Kallapur S., Ormsby I. & Doetschman T.** 1999. Strain dependency of TGFbeta1 function during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 52: 341-349.
- Kanzawa S., Endo H. & Shioya N.** 1993. Improved *in vitro* angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann Plast Surg* 30: 244-251.
- Karabegovic A., Shinawi M., Cymerman U. & Letarte M.** 2004. No live individual homozygous for a novel endoglin mutation was found in a consanguineous Arab family with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 41: e119.
- Katagiri T., Imada M., Yanai T., Suda T., Takahashi N. & Kamijo R.** 2002. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 7: 949-960.
- Kavsak P., Rasmussen R. K., Causing C. G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G. H. & Wrana J. L.** 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6: 1365-1375.
- Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J. & Connolly D. T.** 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246: 1309-1312.
- Kendall R. L. & Thomas K. A.** 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10705-10709.
- Kevil C. G., Payne D. K., Mire E. & Alexander J. S.** 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273: 15099-15103.
- Kim J., Johnson K., Chen H. J., Carroll S. & Laughon A.** 1997. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388: 304-308.
- Kim R. Y., Robertson E. J. & Solloway M. J.** 2001. Bmp6 and Bmp7 are required for cushion formation and septation in the developing mouse heart. *Dev Biol* 235: 449-466.
- Kim S., Lee Y., Seo J. E., Cho K. H. & Chung J. H.** 2008. Caveolin-1 increases basal and TGF-beta1-induced expression of type I procollagen through PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway in human dermal fibroblasts. *Cell Signal* 20: 1313-1319.
- Kim Y. M., Hwang S., Pyun B. J., Kim T. Y., Lee S. T., Gho Y. S. & Kwon Y. G.** 2002. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 277: 27872-27879.
- Kingsley D. M., Bland A. E., Grubber J. M., Marker P. C., Russell L. B., Copeland N. G. & Jenkins N. A.** 1992. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 71: 399-410.

Kirsch T., Nickel J. & Sebald W. 2000a. BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J* 19: 3314-3324.

Kirsch T., Sebald W. & Dreyer M. K. 2000b. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7: 492-496.

Kiyono M. & Shibuya M. 2003. Bone morphogenetic protein 4 mediates apoptosis of capillary endothelial cells during rat pupillary membrane regression. *Mol Cell Biol* 23: 4627-4636.

Kiyono M. & Shibuya M. 2006. Inhibitory Smad transcription factors protect arterial endothelial cells from apoptosis induced by BMP4. *Oncogene* 25: 7131-7137.

Knaus P. & Sebald W. 2001. Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily. *Biol Chem* 382: 1189-1195.

Knockaert M., Sapkota G., Alarcon C., Massague J. & Brivanlou A. H. 2006. Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11940-11945.

Koenig B. B., Cook J. S., Wolsing D. H., Ting J., Tiesman J. P., Correa P. E., Olson C. A., Pecquet A. L., Ventura F., Grant R. A., Chen G. X., Wrana J. L., Massague J. & Rosenbaum J. S. 1994. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14: 5961-5974.

Kohn S., Nagy J. A., Dvorak H. F. & Dvorak A. M. 1992. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest* 67: 596-607.

Koleva R. I., Conley B. A., Romero D., Riley K. S., Marto J. A., Lux A. & Vary C. P. 2006. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 281: 25110-25123.

Komuro A., Imamura T., Saitoh M., Yoshida Y., Yamori T., Miyazono K. & Miyazawa K. 2004. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23: 6914-6923.

Kondaiah P., Sands M. J., Smith J. M., Fields A., Roberts A. B., Sporn M. B. & Melton D. A. 1990. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 265: 1089-1093.

Kopetz S., Hoff P. M., Morris J. S., Wolff R. A., Eng C., Glover K. Y., Adinin R., Overman M. J., Valero V., Wen S., Lieu C., Yan S., Tran H. T., Ellis L. M., Abbruzzese J. L. & Heymach J. V. 2010. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* 28: 453-459.

Korchynskyi O. & ten Dijke P. 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277: 4883-4891.

Korff T. & Augustin H. G. 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143: 1341-1352.

Korff T., Kimmina S., Martiny-Baron G. & Augustin H. G. 2001. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15: 447-457.

Kretzschmar M., Doody J. & Massague J. 1997a. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389: 618-622.

Kretzschmar M., Liu F., Hata A., Doody J. & Massague J. 1997b. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11: 984-995.

Kretzschmar M., Doody J., Timokhina I. & Massague J. 1999. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804-816.

Krummel T. M., Michna B. A., Thomas B. L., Sporn M. B., Nelson J. M., Salzberg A. M., Cohen I. K. & Diegelmann R. F. 1988. Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. *J Pediatr Surg* 23: 647-652.

Kume S., Haneda M., Kanasaki K., Sugimoto T., Araki S., Isshiki K., Isono M., Uzu T., Guarente L., Kashiwagi A. & Koya D. 2007. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 282: 151-158.

Kurisasi A., Kose S., Yoneda Y., Heldin C. H. & Moustakas A. 2001. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* 12: 1079-1091.

Kurisasi A., Kurisasi K., Kowanetz M., Sugino H., Yoneda Y., Heldin C. H. & Moustakas A. 2006. The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran. *Mol Cell Biol* 26: 1318-1332.

Kurstin R. 2002. Using thalidomide in a patient with epithelioid leiomyosarcoma and Osler-Weber-Rendu disease. *Oncology (Williston Park)* 16: 21-24.

Kwei S., Stavrakis G., Takahas M., Taylor G., Folkman M. J., Gimbrone M. A., Jr. & Garcia-Cardena G. 2004. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterIALIZATION in mice. *Am J Pathol* 164: 81-89.

Lagna G., Hata A., Hemmati-Brivanlou A. & Massague J. 1996. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832-836.

Lagna G., Nguyen P. H., Ni W. & Hata A. 2006. BMP-dependent activation of caspase-9 and caspase-8 mediates apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291: L1059-1067.

Lamouille S., Mallet C., Feige J. J. & Bailly S. 2002. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100: 4495-4501.

Lamouille S. & Derynck R. 2007. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 178: 437-451.

Lan Y., Liu B., Yao H., Li F., Weng T., Yang G., Li W., Cheng X., Mao N. & Yang X. 2007. Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Mol Cell Biol* 27: 7683-7692.

Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chisoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R. A., Muzny D. M., Scherer S. E., Bouck J. B., Sodergren E. J., Worley K. C., Rives C. M., Gorrell J. H., Metzker M. L., Naylor S. L., Kucherlapati R. S., Nelson D. L., Weinstock

G. M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D. R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H. M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R. W., Federspiel N. A., Abola A. P., Proctor M. J., Myers R. M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D. R., Olson M. V., Kaul R., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G. A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B. A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W. R., de la Bastide M., Dedhia N., Blocker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J. A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D. G., Burge C. B., Cerutti L., Chen H. C., Church D., Clamp M., Copley R. R., Doerks T., Eddy S. R., Eichler E. E., Furey T. S., Galagan J., Gilbert J. G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L. S., Jones T. A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W. J., Kitts P., Koonin E. V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T. M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J. V., Mulder N., Pollara V. J., Ponting C. P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A. F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y. I., Wolfe K. H., Yang S. P., Yeh R. F., Collins F., Guyer M. S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K. A., Patrinos A., Morgan M. J., de Jong P., Catanese J. J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S. & Chen Y. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.

Lane K. B., Machado R. D., Pauciulo M. W., Thomson J. R., Phillips J. A., 3rd, Loyd J. E., Nichols W. C. & Trembath R. C. 2000. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* 26: 81-84.

Langenfeld E. M. & Langenfeld J. 2004. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2: 141-149.

Larrain J., Oelgeschlager M., Ketpura N. I., Reversade B., Zakin L. & De Robertis E. M. 2001. Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development* 128: 4439-4447.

Larsson J., Goumans M. J., Sjostrand L. J., van Rooijen M. A., Ward D., Leveen P., Xu X., ten Dijke P., Mummery C. L. & Karlsson S. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 20: 1663-1673.

Lastres P., Bellon T., Cabanas C., Sanchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., Letarte M. & Bernabeu C. 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393-397.

Lastres P., Letamendia A., Zhang H., Rius C., Almendro N., Raab U., Lopez L. A., Langa C., Fabra A., Letarte M. & Bernabeu C. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* 133: 1109-1121.

Lawler J., Weinstein R. & Hynes R. O. 1988. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* 107: 2351-2361.

Lawler S., Feng X. H., Chen R. H., Maruoka E. M., Turck C. W., Griswold-Prenner I. & Derynck R. 1997. The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem* 272: 14850-14859.

Lawley T. J. & Kubota Y. 1989. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J Invest Dermatol* 93: 59S-61S.

- Lawrence D. A., Pircher R. & Jullien P.** 1985. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 1026-1034.
- Lawrence D. A.** 1991. Identification and activation of latent transforming growth factor beta. *Methods Enzymol* 198: 327-336.
- Le Good J. A., Joubin K., Giraldez A. J., Ben-Haim N., Beck S., Chen Y., Schier A. F. & Constam D. B.** 2005. Nodal stability determines signaling range. *Curr Biol* 15: 31-36.
- Le Roy C. & Wrana J. L.** 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 112-126.
- Leblanc E., Trens F., Haroun S., Drouin G., Bergeron E., Penton C. M., Montanaro F., Roux S., Faucheux N. & Grenier G.** 2010. BMP9-Induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J Bone Miner Res*.
- Lebrin F., Goumans M. J., Jonker L., Carvalho R. L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H. M. & ten Dijke P.** 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23: 4018-4028.
- Lebrin F., Srun S., Raymond K., Martin S., van den Brink S., Freitas C., Breant C., Mathivet T., Larrivee B., Thomas J. L., Arthur H. M., Westermann C. J., Disch F., Mager J. J., Snijder R. J., Eichmann A. & Mummery C. L.** 2010. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* 16: 420-428.
- Lechleider R. J., Ryan J. L., Garrett L., Eng C., Deng C., Wynshaw-Boris A. & Roberts A. B.** 2001. Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol* 240: 157-167.
- Lederman R. J., Mendelsohn F. O., Anderson R. D., Saucedo J. F., Tenaglia A. N., Hermiller J. B., Hillegass W. B., Rocha-Singh K., Moon T. E., Whitehouse M. J. & Annex B. H.** 2002. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359: 2053-2058.
- Lee-Hoeflich S. T., Causing C. G., Podkowa M., Zhao X., Wrana J. L. & Attisano L.** 2004. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* 23: 4792-4801.
- Lee J., Gray A., Yuan J., Luoh S. M., Avraham H. & Wood W. I.** 1996. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1988-1992.
- Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R. & Thompson E. W.** 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172: 973-981.
- Lee M. K., Pardoux C., Hall M. C., Lee P. S., Warburton D., Qing J., Smith S. M. & Derynck R.** 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 26: 3957-3967.
- Lee N. P., Matevski D., Dumitru D., Piovesan B., Rushlow D. & Gallie B. L.** 2011. Identification of clinically relevant mosaicism in type I hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 48: 353-357.
- Lee N. Y. & Blobel G. C.** 2007. The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* 282: 21507-21517.
- Lee N. Y., Haney J. C., Sogani J. & Blobel G. C.** 2009. Casein kinase 2beta as a novel enhancer of activin-like receptor-1 signaling. *FASEB J* 23: 3712-3721.

Lee P. S., Chang C., Liu D. & Derynck R. 2003. Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* 278: 27853-27863.

Lesca G., Burnichon N., Raux G., Tosi M., Pinson S., Marion M. J., Babin E., Gilbert-Dussardier B., Riviere S., Goizet C., Faivre L., Plauchu H., Frebourg T., Calender A. & Giraud S. 2006. Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat* 27: 598.

Lesca G., Olivieri C., Burnichon N., Pagella F., Carette M. F., Gilbert-Dussardier B., Goizet C., Roume J., Rabilloud M., Saurin J. C., Cottin V., Honnorat J., Coulet F., Giraud S., Calender A., Danesino C., Buscarini E. & Plauchu H. 2007. Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network. *Genet Med* 9: 14-22.

Lesca G., Genin E., Blachier C., Olivieri C., Coulet F., Brunet G., Dupuis-Girod S., Buscarini E., Soubrier F., Calender A., Danesino C., Giraud S. & Plauchu H. 2008. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: evidence for regional founder effects of ACVRL1 mutations in French and Italian patients. *Eur J Hum Genet* 16: 742-749.

Letamendia A., Lastres P., Botella L. M., Raab U., Langa C., Velasco B., Attisano L. & Bernabeu C. 1998. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273: 33011-33019.

Letarte M., McDonald M. L., Li C., Kathirkamathamby K., Vera S., Pece-Barbara N. & Kumar S. 2005. Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res* 68: 155-164.

Letteboer T. G., Mager J. J., Snijder R. J., Koeleman B. P., Lindhout D., Ploos van Amstel J. K. & Westermann C. J. 2006. Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 43: 371-377.

Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V. & Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.

Lewis K. A., Gray P. C., Blount A. L., MacConell L. A., Wiater E., Bilezikjian L. M. & Vale W. 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404: 411-414.

Li B., Yin W., Hong X., Shi Y., Wang H. S., Lin S. F. & Tang S. B. 2008. Remodeling retinal neovascularization by ALK1 gene transfection *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4553-4560.

Li C., Guo B., Wilson P. B., Stewart A., Byrne G., Bundred N. & Kumar S. 2000a. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 89: 122-126.

Li C., Hampson I. N., Hampson L., Kumar P., Bernabeu C. & Kumar S. 2000b. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14: 55-64.

Li C., Guo B., Ding S., Rius C., Langa C., Kumar P., Bernabeu C. & Kumar S. 2003a. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* 23: 1189-1196.

Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I. N., Lopez-Novoa J. M., Bernabeu C. & Kumar S. 2003b. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* 116: 2677-2685.

Li D. Y., Sorensen L. K., Brooke B. S., Urness L. D., Davis E. C., Taylor D. G., Boak B. B. & Wendel D. P. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534-1537.

- Li J. Z., Hankins G. R., Kao C., Li H., Kammauff J. & Helm G. A.** 2003a. Osteogenesis in rats induced by a novel recombinant helper-dependent bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) adenovirus. *J Gene Med* 5: 748-756.
- Li J. Z., Li H., Dunford B., Holman D., Beres B., Pittman D. D., Hankins G. R. & Helm G. A.** 2003b. Rat strain differences in the ectopic osteogenic potential of recombinant human BMP adenoviruses. *Mol Ther* 8: 822-829.
- Li J. Z., Li H., Sasaki T., Holman D., Beres B., Dumont R. J., Pittman D. D., Hankins G. R. & Helm G. A.** 2003c. Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther* 10: 1735-1743.
- Li J. Z., Li H., Hankins G. R., Dunford B. & Helm G. A.** 2005. Local immunomodulation with CD4 and CD8 antibodies, but not cyclosporine A, improves osteogenesis induced by ADhBMP9 gene therapy. *Gene Ther* 12: 1235-1241.
- Lin L., Valore E. V., Nemeth E., Goodnough J. B., Gabayan V. & Ganz T.** 2007. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 110: 2182-2189.
- Lin L. F., Doherty D. H., Lile J. D., Bektesh S. & Collins F.** 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-1132.
- Lin S. J., Hu Y., Zhu J., Woodruff T. K. & Jardetzky T. S.** 2011. Structure of betaglycan zona pellucida (ZP)-C domain provides insights into ZP-mediated protein polymerization and TGF-beta binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5232-5236.
- Lin X., Liang M. & Feng X. H.** 2000. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 275: 36818-36822.
- Lin X., Liang M., Liang Y. Y., Brunicardi F. C. & Feng X. H.** 2003. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278: 31043-31048.
- Lin X., Duan X., Liang Y. Y., Su Y., Wrighton K. H., Long J., Hu M., Davis C. M., Wang J., Brunicardi F. C., Shi Y., Chen Y. G., Meng A. & Feng X. H.** 2006. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125: 915-928.
- Lindahl P., Johansson B. R., Leveen P. & Betsholtz C.** 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277: 242-245.
- Ling N., Ying S. Y., Ueno N., Esch F., Denoroy L. & Guillemain R.** 1985. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7217-7221.
- Ling N., Ying S. Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M. & Guillemain R.** 1986a. A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 1129-1137.
- Ling N., Ying S. Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M. & Guillemain R.** 1986b. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321: 779-782.
- Little S. C. & Mullins M. C.** 2009. Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol* 11: 637-643.
- Liu C., Xu P., Lamouille S., Xu J. & Derynck R.** 2009. TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 35: 26-36.
- Liu D., Wang J., Kinzel B., Mueller M., Mao X., Valdez R., Liu Y. & Li E.** 2007. Dosage-dependent requirement of BMP type II receptor for maintenance of vascular integrity. *Blood* 110: 1502-1510.

Liu F., Hata A., Baker J. C., Doody J., Carcamo J., Harland R. M. & Massague J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620-623.

Liu F., Pouponnot C. & Massague J. 1997. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 11: 3157-3167.

Liu I. M., Schilling S. H., Knouse K. A., Choy L., Derynck R. & Wang X. F. 2009. TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *EMBO J* 28: 88-98.

Liu W., Selever J., Wang D., Lu M. F., Moses K. A., Schwartz R. J. & Martin J. F. 2004. Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4489-4494.

Liu Y., Cox S. R., Morita T. & Kourembanas S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77: 638-643.

Liu Z. J., Shirakawa T., Li Y., Soma A., Oka M., Dotto G. P., Fairman R. M., Velazquez O. C. & Herlyn M. 2003. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 14-25.

Llorca O., Trujillo A., Blanco F. J. & Bernabeu C. 2007. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 365: 694-705.

Llovet J. M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J. F., de Oliveira A. C., Santoro A., Raoul J. L., Forner A., Schwartz M., Porta C., Zeuzem S., Bolondi L., Greten T. F., Galle P. R., Seitz J. F., Borbath I., Haussinger D., Giannaris T., Shan M., Moscovici M., Voliotis D. & Bruix J. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378-390.

Loeys B. L., Chen J., Neptune E. R., Judge D. P., Podowski M., Holm T., Meyers J., Leitch C. C., Katsanis N., Sharifi N., Xu F. L., Myers L. A., Spevak P. J., Cameron D. E., De Backer J., Hellemans J., Chen Y., Davis E. C., Webb C. L., Kress W., Coucke P., Rifkin D. B., De Paepe A. M. & Dietz H. C. 2005. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* 37: 275-281.

Loeys B. L., Schwarze U., Holm T., Callewaert B. L., Thomas G. H., Pannu H., De Backer J. F., Oswald G. L., Symoens S., Manouvrier S., Roberts A. E., Faravelli F., Greco M. A., Pyeritz R. E., Milewicz D. M., Coucke P. J., Cameron D. E., Braverman A. C., Byers P. H., De Paepe A. M. & Dietz H. C. 2006. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med* 355: 788-798.

Long J., Wang G., He D. & Liu F. 2004. Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem J* 379: 23-29.

Long L., MacLean M. R., Jeffery T. K., Morecroft I., Yang X., Rudarakanchana N., Southwood M., James V., Trembath R. C. & Morrell N. W. 2006. Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res* 98: 818-827.

Lopez-Casillas F., Wrana J. L. & Massague J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444.

Lopez-Coviella I., Berse B., Krauss R., Thies R. S. & Blusztajn J. K. 2000. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science* 289: 313-316.

Lopez-Coviella I., Mellott T. M., Kovacheva V. P., Berse B., Slack B. E., Zemelko V., Schnitzler A. & Blusztajn J. K. 2006. Developmental pattern of expression of BMP

receptors and Smads and activation of Smad1 and Smad5 by BMP9 in mouse basal forebrain. *Brain Res* 1088: 49-56.

Lopez-Novoa J. M. & Bernabeu C. 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H959-974.

Lopez-Rovira T., Chalaux E., Massague J., Rosa J. L. & Ventura F. 2002. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 277: 3176-3185.

Luo G., Hofmann C., Bronckers A. L., Sohocki M., Bradley A. & Karsenty G. 1995. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9: 2808-2820.

Luo J., Tang M., Huang J., He B. C., Gao J. L., Chen L., Zuo G. W., Zhang W., Luo Q., Shi Q., Zhang B. Q., Bi Y., Luo X., Jiang W., Su Y., Shen J., Kim S. H., Huang E., Gao Y., Zhou J. Z., Yang K., Luu H. H., Pan X., Haydon R. C., Deng Z. L. & He T. C. 2010. TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 285: 29588-29598.

Luo K. & Lodish H. F. 1997. Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J* 16: 1970-1981.

Luo K. 2004. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* 14: 65-70.

Lux A., Attisano L. & Marchuk D. A. 1999. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 274: 9984-9992.

Lux A., Salway F., Dressman H. K., Kroner-Lux G., Hafner M., Day P. J., Marchuk D. A. & Garland J. 2006. ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord* 6: 13.

Lyden D., Young A. Z., Zagzag D., Yan W., Gerald W., O'Reilly R., Bader B. L., Hynes R. O., Zhuang Y., Manova K. & Benezra R. 1999. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401: 670-677.

Lyons R. M., Keski-Oja J. & Moses H. L. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106: 1659-1665.

Lyons R. M., Gentry L. E., Purchio A. F. & Moses H. L. 1990. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110: 1361-1367.

Machado R. D., Pauciulo M. W., Thomson J. R., Lane K. B., Morgan N. V., Wheeler L., Phillips J. A., 3rd, Newman J., Williams D., Galie N., Manes A., McNeil K., Yacoub M., Mikhail G., Rogers P., Corris P., Humbert M., Donnai D., Martensson G., Tranebjaerg L., Loyd J. E., Trembath R. C. & Nichols W. C. 2001. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* 68: 92-102.

Machado R. D., Rudarakanchana N., Atkinson C., Flanagan J. A., Harrison R., Morrell N. W. & Trembath R. C. 2003. Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 12: 3277-3286.

Machado R. D., Aldred M. A., James V., Harrison R. E., Patel B., Schwalbe E. C., Gruenig E., Janssen B., Koehler R., Seeger W., Eickelberg O., Olschewski H., Elliott C. G., Glissmeyer E., Carlquist J., Kim M., Torbicki A., Fijalkowska A., Szewczyk G., Parma J., Abramowicz M. J., Galie N., Morisaki H., Kyotani S., Nakanishi N., Morisaki

T., Humbert M., Simonneau G., Sitbon O., Soubrier F., Coulet F., Morrell N. W. & Trembath R. C. 2006. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 27: 121-132.

Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless P. A., Pirone R., Attisano L. & Wrana J. L. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.

Macias-Silva M., Hoodless P. A., Tang S. J., Buchwald M. & Wrana J. L. 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273: 25628-25636.

Madisen L., Webb N. R., Rose T. M., Marquardt H., Ikeda T., Twardzik D., Seyedin S. & Purchio A. F. 1988. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* 7: 1-8.

Maeshima Y., Colorado P. C. & Kalluri R. 2000. Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* 275: 23745-23750.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P. & Persico M. G. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9267-9271.

Mahmoud M., Borthwick G. M., Hislop A. A. & Arthur H. M. 2009. Endoglin and activin receptor-like-kinase 1 are co-expressed in the distal vessels of the lung: implications for two familial vascular dysplasias, HHT and PAH. *Lab Invest* 89: 15-25.

Mahmoud M., Allinson K. R., Zhai Z., Oakenfull R., Ghandi P., Adams R. H., Fruttiger M. & Arthur H. M. 2010. Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res* 106: 1425-1433.

Mahmoud M., Pia Cumine A., Oh S. & Arthur H. M. 2011. Characterisation of arteriovenous malformation development in two inducible mouse models of HHT1 and HHT2. *Hematology reports* 3: 24.

Maisonpierre P. C., Suri C., Jones P. F., Bartunkova S., Wiegand S. J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T. H., Papadopoulos N., Daly T. J., Davis S., Sato T. N. & Yancopoulos G. D. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 277: 55-60.

Majumdar M. K., Wang E. & Morris E. A. 2001. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189: 275-284.

Makanya A. N., Hlushchuk R. & Djonov V. G. 2009. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 12: 113-123.

Mancini M. L., Terzic A., Conley B. A., Oxburgh L. H., Nicola T. & Vary C. P. 2009. Endoglin plays distinct roles in vascular smooth muscle cell recruitment and regulation of arteriovenous identity during angiogenesis. *Dev Dyn* 238: 2479-2493.

Mancuso P., Shalinsky D. R., Calleri A., Quarna J., Antoniotti P., Jilani I., Hu-Lowe D., Jiang X., Gallo-Stampino C. & Bertolini F. 2009. Evaluation of ALK-1 expression in circulating endothelial cells (CECs) as an exploratory biomarker for PF-03446962 undergoing phase I trial in cancer patients. *J Clin Oncol* 27: abstr 3573.

Marrony S., Bassilana F., Seuwen K. & Keller H. 2003. Bone morphogenetic protein 2 induces placental growth factor in mesenchymal stem cells. *Bone* 33: 426-433.

Mason A. J., Hayflick J. S., Ling N., Esch F., Ueno N., Ying S. Y., Guillemin R., Niall H. & Seeburg P. H. 1985. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. *Nature* 318: 659-663.

- Massague J. & Like B.** 1985. Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines. *J Biol Chem* 260: 2636-2645.
- Massague J.** 1987. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437-438.
- Massague J.** 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.
- Massague J.** 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178.
- Massague J., Seoane J. & Wotton D.** 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19: 2783-2810.
- Mathews L. S. & Vale W. W.** 1991. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973-982.
- Matsuura I., Denissova N. G., Wang G., He D., Long J. & Liu F.** 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 430: 226-231.
- Matyas G., Arnold E., Carrel T., Baumgartner D., Boileau C., Berger W. & Steinmann B.** 2006. Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan syndrome-related disorders. *Hum Mutat* 27: 760-769.
- Mazzone M., Dettori D., Leite de Oliveira R., Loges S., Schmidt T., Jonckx B., Tian Y. M., Lanahan A. A., Pollard P., Ruiz de Almodovar C., De Smet F., Vinckier S., Aragonés J., Debackere K., Luttun A., Wyns S., Jordan B., Pisacane A., Gallez B., Lampugnani M. G., Dejane E., Simons M., Ratcliffe P., Maxwell P. & Carmeliet P.** 2009. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 136: 839-851.
- McAllister K. A., Grogg K. M., Johnson D. W., Gallione C. J., Baldwin M. A., Jackson C. E., Helmbold E. A., Markel D. S., McKinnon W. C., Murrell J., McCormick M. K., Pericak-Vance M. A., Heutink P., Oostra B. A., Haitjema T., Westerman C. J. J., Porteous M. E., Guttmacher A. E., Letarte M. & Marchuk D. A.** 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8: 345-351.
- McAllister K. A., Baldwin M. A., Thukkani A. K., Gallione C. J., Berg J. N., Porteous M. E., Guttmacher A. E. & Marchuk D. A.** 1995. Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum Mol Genet* 4: 1983-1985.
- McCullagh D. R.** 1932. Dual Endocrine Activity of the Testes. *Science* 76: 19-20.
- McDonald D. M. & Baluk P.** 2005. Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128: 602S-608S.
- McDonald J., Damjanovich K., Millson A., Woodechak W., Chibuk J. M., Stevenson D. A., Gedge F. & Bayrak-Toydemir P.** 2011. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clin Genet* 79: 335-344.
- Meyrick B. O., Friedman D. B., Billheimer D. D., Cogan J. D., Prince M. A., Phillips J. A., 3rd & Loyd J. E.** 2008. Proteomics of transformed lymphocytes from a family with familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 99-107.
- Millauer B., Witzmann-Voos S., Schnurch H., Martinez R., Moller N. P., Risau W. & Ullrich A.** 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835-846.
- Miller A. F., Harvey S. A., Thies R. S. & Olson M. S.** 2000. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem* 275: 17937-17945.

- Minchiotti G., Parisi S., Liguori G., Signore M., Lania G., Adamson E. D., Lago C. T. & Persico M. G.** 2000. Membrane-anchorage of Cripto protein by glycosylphosphatidylinositol and its distribution during early mouse development. *Mech Dev* 90: 133-142.
- Mitchell A., Adams L. A., MacQuillan G., Tibballs J., vanden Driesen R. & Delriviere L.** 2008. Bevacizumab reverses need for liver transplantation in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Liver Transpl* 14: 210-213.
- Mitchell D., Pobre E. G., Mulivor A. W., Grinberg A. V., Castonguay R., Monnell T. E., Solban N., Ucran J. A., Pearsall R. S., Underwood K. W., Seehra J. & Kumar R.** 2010. ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer Ther* 9: 379-388.
- Miura S., Takeshita T., Asao H., Kimura Y., Murata K., Sasaki Y., Hanai J. I., Beppu H., Tsukazaki T., Wrana J. L., Miyazono K. & Sugamura K.** 2000. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 20: 9346-9355.
- Miyazono K., Hellman U., Wernstedt C. & Heldin C. H.** 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* 263: 6407-6415.
- Miyazono K. & Heldin C. H.** 1989. Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature* 338: 158-160.
- Miyazono K., Kamiya Y. & Morikawa M.** 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147: 35-51.
- Montani D., Sitbon O., Jais X., Cabrol S., Simonneau G. & Humbert M.** 2005. [Treatment of pulmonary arterial hypertension]. *Presse Med* 34: 1445-1455.
- Moorman A. F. & Christoffels V. M.** 2003. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev* 83: 1223-1267.
- Moren A., Imamura T., Miyazono K., Heldin C. H. & Moustakas A.** 2005. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 280: 22115-22123.
- Morrell N. W., Yang X., Upton P. D., Jourdan K. B., Morgan N., Sheares K. K. & Trembath R. C.** 2001. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* 104: 790-795.
- Morrell N. W.** 2006. Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? *Proc Am Thorac Soc* 3: 680-686.
- Moser M., Binder O., Wu Y., Aitsebaomo J., Ren R., Bode C., Bautch V. L., Conlon F. L. & Patterson C.** 2003. BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* 23: 5664-5679.
- Motzer R. J., Hutson T. E., Tomczak P., Michaelson M. D., Bukowski R. M., Rixe O., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Kim S. T., Chen I., Bycott P. W., Baum C. M. & Figlin R. A.** 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356: 115-124.
- Moya I., Umans L., Sents W., Maas E., Robertson L., Huylebroeck D. & Zwijsen A.** 2010. Crosstalk between Notch and Smad1/5 signaling cascades control stalk cell identity in angiogenic sprouts. 8th international conference on BMPs 8: 102.
- Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Breant C. & Eichmann A.** 2001. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 128: 3359-3370.

- Mucsi I., Skorecki K. L. & Goldberg H. J.** 1996. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem* 271: 16567-16572.
- Mulder K. M. & Morris S. L.** 1992. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* 267: 5029-5031.
- Munger J. S., Huang X., Kawakatsu H., Griffiths M. J., Dalton S. L., Wu J., Pittet J. F., Kaminski N., Garat C., Matthay M. A., Rifkin D. B. & Sheppard D.** 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328.
- Murakami G., Watabe T., Takaoka K., Miyazono K. & Imamura T.** 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14: 2809-2817.
- Muthukkaruppan V. & Auerbach R.** 1979. Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205: 1416-1418.
- Nakano N., Hori H., Abe M., Shibata H., Arimura T., Sasaoka T., Sawabe M., Chida K., Arai T., Nakahara K., Kubo T., Sugimoto K., Katsuya T., Ogihara T., Doi Y., Izumi T. & Kimura A.** 2007. Interaction of BMP10 with Tcap may modulate the course of hypertensive cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3396-3403.
- Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J. L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N. E., Heldin C. H. & ten Dijke P.** 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389: 631-635.
- Nakaoka T., Gonda K., Ogita T., Otawara-Hamamoto Y., Okabe F., Kira Y., Harii K., Miyazono K., Takuwa Y. & Fujita T.** 1997. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation *in vitro* and *in vivo* by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest* 100: 2824-2832.
- Nehls V. & Drenckhahn D.** 1995. A novel, microcarrier-based *in vitro* assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* 50: 311-322.
- Neufeld G., Kessler O. & Herzog Y.** 2002. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Neuropilin: From Nervous System to Vascular and Tumor Biology* 515: 81-90.
- Neuhaus H., Rosen V. & Thies R. S.** 1999. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech Dev* 80: 181-184.
- Nguyen H.-L., Arthur H. M. & Oh S.** 2011. Comparaison of conditional knockout mouse models suggests divergent pathogenetic mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia types 1 and 2. *Hematology reports* 3: 23.
- Nichols J. T., Miyamoto A., Olsen S. L., D'Souza B., Yao C. & Weinmaster G.** 2007. DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J Cell Biol* 176: 445-458.
- Nichols W. C., Koller D. L., Slovis B., Foroud T., Terry V. H., Arnold N. D., Siemieniak D. R., Wheeler L., Phillips J. A., 3rd, Newman J. H., Conneally P. M., Ginsburg D. & Loyd J. E.** 1997. Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet* 15: 277-280.
- Nickel J., Sebald W., Groppe J. C. & Mueller T. D.** 2009. Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 367-377.
- Nicosia R. F. & Ottinetti A.** 1990. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*. *Lab Invest* 63: 115-122.
- Niessen K., Zhang G., Ridgway J. B., Chen H. & Yan M.** 2010. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood* 115: 1654-1661.

Nimmagadda S., Geetha Loganathan P., Huang R., Scaal M., Schmidt C. & Christ B. 2005. BMP4 and noggin control embryonic blood vessel formation by antagonistic regulation of VEGFR-2 (Quek1) expression. *Dev Biol* 280: 100-110.

Nishihara A., Watabe T., Imamura T. & Miyazono K. 2002. Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* 13: 3055-3063.

Nishita M., Hashimoto M. K., Ogata S., Laurent M. N., Ueno N., Shibuya H. & Cho K. W. 2000. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403: 781-785.

Noguera-Troise I., Daly C., Papadopoulos N. J., Coetzee S., Boland P., Gale N. W., Lin H. C., Yancopoulos G. D. & Thurston G. 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444: 1032-1037.

Nohe A., Hassel S., Ehrlich M., Neubauer F., Sebald W., Henis Y. I. & Knaus P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 5330-5338.

Norrby K., Jakobsson A. & Sorbo J. 1986. Mast-cell-mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 52: 195-206.

Norrby K. 2006. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 10: 588-612.

O'Connell P. J., McKenzie A., Fisicaro N., Rockman S. P., Pearse M. J. & d'Apice A. J. 1992. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 90: 154-159.

O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W. S., Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R. & Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285.

Obata H., Kaji Y., Yamada H., Kato M., Tsuru T. & Yamashita H. 1999. Expression of transforming growth factor-beta superfamily receptors in rat eyes. *Acta Ophthalmol Scand* 77: 151-156.

Obi S., Yamamoto K., Shimizu N., Kumagaya S., Masumura T., Sokabe T., Asahara T. & Ando J. 2009. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol* 106: 203-211.

Oelgeschlager M., Larrain J., Geissert D. & De Robertis E. M. 2000. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* 405: 757-763.

Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M. & Honda Y. 1999. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274: 15732-15739.

Oh S. P. & Li E. 1997. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev* 11: 1812-1826.

Oh S. P., Seki T., Goss K. A., Imamura T., Yi Y., Donahoe P. K., Li L., Miyazono K., ten Dijke P., Kim S. & Li E. 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2626-2631.

Ohshima T. & Shimotohno K. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem* 278: 50833-50842.

Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R. F., Alitalo K. & Eriksson U. 1996. Vascular endothelial growth

factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-2581.

Onichtchouk D., Chen Y. G., Dosch R., Gawantka V., Delius H., Massague J. & Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480-485.

Oreffo R. O., Mundy G. R., Seyedin S. M. & Bonewald L. F. 1989. Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 817-823.

Orlandini M., Marconcini L., Ferruzzi R. & Oliviero S. 1996. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11675-11680.

Oshima M., Oshima H. & Taketo M. M. 1996. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179: 297-302.

Ota T., Fujii M., Sugizaki T., Ishii M., Miyazawa K., Aburatani H. & Miyazono K. 2002. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193: 299-318.

Otsuka F., Moore R. K., Iemura S., Ueno N. & Shimasaki S. 2001. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 961-966.

Ozdamar B., Bose R., Barrios-Rodiles M., Wang H. R., Zhang Y. & Wrana J. L. 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307: 1603-1609.

Panchenko M. P., Williams M. C., Brody J. S. & Yu Q. 1996. Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol* 270: L547-558.

Paquet M. E., Pece-Barbara N., Vera S., Cymerman U., Karabegovic A., Shovlin C. & Letarte M. 2001. Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet* 10: 1347-1357.

Pardanaud L. & Dieterlen-Lievre F. 1999. Manipulation of the angiopoietic/hemangiopoietic commitment in the avian embryo. *Development* 126: 617-627.

Park C., Lavine K., Mishina Y., Deng C. X., Ornitz D. M. & Choi K. 2006. Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. *Development* 133: 3473-3484.

Park J. E., Keller G. A. & Ferrara N. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-1326.

Park S. O., Lee Y. J., Seki T., Hong K. H., Fliess N., Jiang Z., Park A., Wu X., Kaartinen V., Roman B. L. & Oh S. P. 2008. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood* 111: 633-642.

Park S. O., Wankhede M., Lee Y. J., Choi E. J., Fliess N., Choe S. W., Oh S. H., Walter G., Raizada M. K., Sorg B. S. & Oh S. P. 2009. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 119: 3487-3496.

Parker L., Stathakis D. G. & Arora K. 2004. Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog Mol Subcell Biol* 34: 73-101.

Passaniti A., Taylor R. M., Pili R., Guo Y., Long P. V., Haney J. A., Pauly R. R., Grant D. S. & Martin G. R. 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis

and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67: 519-528.

Pece-Barbara N., Cymerman U., Vera S., Marchuk D. A. & Letarte M. 1999. Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet* 8: 2171-2181.

Pece-Barbara N., Vera S., Kathirkamathamby K., Liebner S., Di Guglielmo G. M., Dejana E., Wrana J. L. & Letarte M. 2005. Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* 280: 27800-27808.

Pece N., Vera S., Cymerman U., White R. I., Jr., Wrana J. L. & Letarte M. 1997. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest* 100: 2568-2579.

Pepper M. S., Belin D., Montesano R., Orci L. & Vassalli J. D. 1990. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 111: 743-755.

Perez-Encinas M., Rabunal Martínez M. J. & Bello Lopez J. L. 2002. Is thalidomide effective for the treatment of gastrointestinal bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia? *Haematologica* 87: ELT34.

Perros F., Dorfmueller P., Souza R., Durand-Gasselin I., Mussot S., Mazmanian M., Herve P., Emilie D., Simonneau G. & Humbert M. 2007. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 29: 462-468.

Perros F., Montani D., Dorfmueller P., Durand-Gasselin I., Tcherakian C., Le Pavec J., Mazmanian M., Fadel E., Mussot S., Mercier O., Herve P., Emilie D., Eddahibi S., Simonneau G., Souza R. & Humbert M. 2008. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 81-88.

Peterson R. S., Andhare R. A., Rousche K. T., Knudson W., Wang W., Grossfield J. B., Thomas R. O., Hollingsworth R. E. & Knudson C. B. 2004. CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway. *J Cell Biol* 166: 1081-1091.

Pielsticker E. J., Martinez F. J. & Rubenfire M. 2001. Lung and heart-lung transplant practice patterns in pulmonary hypertension centers. *J Heart Lung Transplant* 20: 1297-1304.

Pierreux C. E., Nicolas F. J. & Hill C. S. 2000. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20: 9041-9054.

Pietra G. G. 1994. Histopathology of primary pulmonary hypertension. *Chest* 105: 2S-6S.

Planel S., Salomon A., Jalinot P., Feige J. J. & Cherradi N. 2010. A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1. *Oncogene* 29: 5989-6003.

Plauchu H., de Chadarevian J. P., Bideau A. & Robert J. M. 1989. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 32: 291-297.

Ploemacher R. E., Engels L. J., Mayer A. E., Thies S. & Neben S. 1999. Bone morphogenetic protein 9 is a potent synergistic factor for murine hemopoietic progenitor cell generation and colony formation in serum-free cultures. *Leukemia* 13: 428-437.

Plouet J., Schilling J. & Gospodarowicz D. 1989. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 8: 3801-3806.

- Qin B. Y., Chacko B. M., Lam S. S., de Caestecker M. P., Correia J. J. & Lin K.** 2001. Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol Cell* 8: 1303-1312.
- Qiu Y., Hoareau-Aveilla C., Oltean S., Harper S. J. & Bates D. O.** 2009. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans* 37: 1207-1213.
- Qu R., Silver M. M. & Letarte M.** 1998. Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292: 333-343.
- Quackenbush E. J. & Letarte M.** 1985. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol* 134: 1276-1285.
- Quackenbush E. J., Gougos A., Baumal R. & Letarte M.** 1986. Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 136: 118-124.
- Quinn T. P., Peters K. G., De Vries C., Ferrara N. & Williams L. T.** 1993. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7533-7537.
- Raida M., Clement J. H., Leek R. D., Ameri K., Bicknell R., Niederwieser D. & Harris A. L.** 2005. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 741-750.
- Raida M., Heymann A. C., Gunther C. & Niederwieser D.** 2006. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 18: 735-739.
- Ramoshebi L. N. & Ripamonti U.** 2000. Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein, induces angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and synergizes with basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1. *Anat Rec* 259: 97-107.
- Reguly T. & Wrana J. L.** 2003. In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends Cell Biol* 13: 216-220.
- Rehn M., Veikkola T., Kukk-Valdre E., Nakamura H., Ilmonen M., Lombardo C., Pihlajaniemi T., Alitalo K. & Vuori K.** 2001. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1024-1029.
- Remy I., Montmarquette A. & Michnick S. W.** 2004. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 6: 358-365.
- Ren R., Charles P. C., Zhang C., Wu Y., Wang H. & Patterson C.** 2007. Gene expression profiles identify a role for cyclooxygenase 2-dependent prostanoid generation in BMP6-induced angiogenic responses. *Blood* 109: 2847-2853.
- Rentzsch F., Zhang J., Kramer C., Sebald W. & Hammerschmidt M.** 2006. Crossveinless 2 is an essential positive feedback regulator of Bmp signaling during zebrafish gastrulation. *Development* 133: 801-811.
- Ribatti D., Vacca A., Roncali L. & Dammacco F.** 1996. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 40: 1189-1197.
- Ricard N., Bidart M., Mallet C., Lesca G., Giraud S., Prudent R., Feige J. J. & Bailly S.** 2010. Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* 116: 1604-1612.
- Rich S., Dantzker D. R., Ayres S. M., Bergofsky E. H., Brundage B. H., Detre K. M., Fishman A. P., Goldring R. M., Groves B. M., Koerner S. K., Levy P. C., Reid L. M., Vreim C. E. & Williams G. W.** 1987. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 107: 216-223.

Ridgway J., Zhang G., Wu Y., Stawicki S., Liang W. C., Chanthery Y., Kowalski J., Watts R. J., Callahan C., Kasman I., Singh M., Chien M., Tan C., Hongo J. A., de Sauvage F., Plowman G. & Yan M. 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444: 1083-1087.

Risau W. & Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91.

Roberts A. B., Anzano M. A., Meyers C. A., Wideman J., Blacher R., Pan Y. C., Stein S., Lehrman S. R., Smith J. M., Lamb L. C. & Sporn M. B. 1983. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 22: 5692-5698.

Roberts A. B., Anzano M. A., Wakefield L. M., Roche N. S., Stern D. F. & Sporn M. B. 1985. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 119-123.

Roberts A. B., Sporn M. B., Assoian R. K., Smith J. M., Roche N. S., Wakefield L. M., Heine U. I., Liotta L. A., Falanga V., Kehrl J. H. & Fauci A. S. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4167-4171.

Roberts A. B. & Sporn M. B. 1989. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am Rev Respir Dis* 140: 1126-1128.

Roelen B. A., van Rooijen M. A. & Mummery C. L. 1997. Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn* 209: 418-430.

Rohan R. M., Fernandez A., Udagawa T., Yuan J. & D'Amato R. J. 2000. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J* 14: 871-876.

Rokhlin O. W., Cohen M. B., Kubagawa H., Letarte M. & Cooper M. D. 1995. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 154: 4456-4465.

Roman B. L., Pham V. N., Lawson N. D., Kulik M., Childs S., Lekven A. C., Garrity D. M., Moon R. T., Fishman M. C., Lechleider R. J. & Weinstein B. M. 2002. Disruption of *acvr1l* increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Development* 129: 3009-3019.

Ross J. J., Shimmi O., Vilmos P., Petryk A., Kim H., Gaudenz K., Hermanson S., Ekker S. C., O'Connor M. B. & Marsh J. L. 2001. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410: 479-483.

Rothhammer T., Bataille F., Spruss T., Eissner G. & Bosserhoff A. K. 2007. Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* 26: 4158-4170.

Rubin L. J. 1997. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336: 111-117.

Rudarakanchana N., Flanagan J. A., Chen H., Upton P. D., Machado R., Patel D., Trembath R. C. & Morrell N. W. 2002. Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 11: 1517-1525.

Rudini N., Felici A., Giampietro C., Lampugnani M., Corada M., Swirsding K., Garre M., Liebner S., Letarte M., ten Dijke P. & Dejana E. 2008. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J* 27: 993-1004.

Rudkin G. H., Yamaguchi D. T., Ishida K., Peterson W. J., Bahadosingh F., Thye D. & Miller T. A. 1996. Transforming growth factor-beta, osteogenin, and bone morphogenetic protein-2 inhibit intercellular communication and alter cell proliferation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Physiol* 168: 433-441.

- Ruhrberg C., Gerhardt H., Golding M., Watson R., Ioannidou S., Fujisawa H., Betsholtz C. & Shima D. T.** 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 16: 2684-2698.
- Runting A. S., Stacker S. A. & Wilks A. F.** 1993. tie2, a putative protein tyrosine kinase from a new class of cell surface receptor. *Growth Factors* 9: 99-105.
- Sadick H., Naim R., Gossler U., Hormann K. & Riedel F.** 2005a. Angiogenesis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: VEGF165 plasma concentration in correlation to the VEGF expression and microvessel density. *Int J Mol Med* 15: 15-19.
- Sadick H., Riedel F., Naim R., Goessler U., Hormann K., Hafner M. & Lux A.** 2005b. Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica* 90: 818-828.
- Saharinen J., Taipale J. & Keski-Oja J.** 1996. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 15: 245-253.
- Sakao S., Taraseviciene-Stewart L., Lee J. D., Wood K., Cool C. D. & Voelkel N. F.** 2005. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J* 19: 1178-1180.
- Samad T. A., Rebbapragada A., Bell E., Zhang Y., Sidis Y., Jeong S. J., Campagna J. A., Perusini S., Fabrizio D. A., Schneyer A. L., Lin H. Y., Brivanlou A. H., Attisano L. & Woolf C. J.** 2005. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280: 14122-14129.
- Sanchez-Elsner T., Botella L. M., Velasco B., Langa C. & Bernabeu C.** 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277: 43799-43808.
- Sanford L. P., Ormsby I., Gittenberger-de Groot A. C., Sariola H., Friedman R., Boivin G. P., Cardell E. L. & Doetschman T.** 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124: 2659-2670.
- Sano Y., Harada J., Tashiro S., Gotoh-Mandeville R., Maekawa T. & Ishii S.** 1999. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274: 8949-8957.
- Santibanez J. F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C. P., Lopez-Novoa J. M., Attisano L. & Bernabeu C.** 2007. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210: 456-468.
- Sanz-Rodriguez F., Guerrero-Esteo M., Botella L. M., Banville D., Vary C. P. & Bernabeu C.** 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 279: 32858-32868.
- Sapkota G., Alarcon C., Spagnoli F. M., Brivanlou A. H. & Massague J.** 2007. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* 25: 441-454.
- Sato T. N., Qin Y., Kozak C. A. & Audus K. L.** 1993. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9355-9358.
- Satow R., Kurisaki A., Chan T. C., Hamazaki T. S. & Asashima M.** 2006. Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Dev Cell* 11: 763-774.
- Savage-Dunn C.** 2001. Targets of TGF beta-related signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 305-312.

Savage C., Das P., Finelli A. L., Townsend S. R., Sun C. Y., Baird S. E. & Padgett R. W. 1996. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 790-794.

Sawabe M., Arai T., Esaki Y., Tsuru M., Fukazawa T. & Takubo K. 2001. Three-dimensional organization of the hepatic microvasculature in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Pathol Lab Med* 125: 1219-1223.

Scharpfenecker M., van Dinther M., Liu Z., van Bezooijen R. L., Zhao Q., Pukac L., Lowik C. W. & ten Dijke P. 2007. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120: 964-972.

Schier A. F. 2003. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 589-621.

Schlunegger M. P. & Grutter M. G. 1992. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* 358: 430-434.

Schmierer B. & Hill C. S. 2005. Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol Cell Biol* 25: 9845-9858.

Schmierer B. & Hill C. S. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 970-982.

Schneyer A. L., Rzucidlo D. A., Sluss P. M. & Crowley W. F., Jr. 1994. Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. *Endocrinology* 135: 667-674.

Schnitzler A. C., Mellott T. J., Lopez-Coviella I., Tallini Y. N., Kotlikoff M. I., Follettie M. T. & Blusztajn J. K. 2010. BMP9 (bone morphogenetic protein 9) induces NGF as an autocrine/paracrine cholinergic trophic factor in developing basal forebrain neurons. *J Neurosci* 30: 8221-8228.

Schultz-Cherry S., Lawler J. & Murphy-Ullrich J. E. 1994. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269: 26783-26788.

Schultz-Cherry S. & Hinshaw V. S. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol* 70: 8624-8629.

Schwappacher R., Weiske J., Heining E., Ezerski V., Marom B., Henis Y. I., Huber O. & Knaus P. 2009. Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *EMBO J* 28: 1537-1550.

Seals D. F. & Courtneidge S. A. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17: 7-30.

Sebald W., Nickel J., Zhang J. L. & Mueller T. D. 2004. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* 385: 697-710.

Seemann P., Brehm A., König J., Reissner C., Stricker S., Kuss P., Haupt J., Renninger S., Nickel J., Sebald W., Groppe J. C., Ploger F., Pohl J., Schmidt-von Kegler M., Walther M., Gassner I., Rusu C., Janecke A. R., Dathe K. & Mundlos S. 2009. Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet* 5: e1000747.

Sekelsky J. J., Newfeld S. J., Raftery L. A., Chartoff E. H. & Gelbart W. M. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139: 1347-1358.

Seki T., Hong K. H. & Oh S. P. 2006. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 86: 116-129.

Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S. & Dvorak H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.

Senger D. R., Perruzzi C. A., Feder J. & Dvorak H. F. 1986. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 46: 5629-5632.

Sengle G., Ono R. N., Sasaki T. & Sakai L. Y. 2010. Prodomains of transforming growth factor {beta} (TGF{beta}) superfamily members specify different functions: Extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem*.

Seo S. R., Lallemand F., Ferrand N., Pessah M., L'Hoste S., Camonis J. & Atfi A. 2004. The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J* 23: 3780-3792.

Seoane J., Le H. V., Shen L., Anderson S. A. & Massague J. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211-223.

Serbedzija G. N., Flynn E. & Willett C. E. 1999. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3: 353-359.

Shaked Y., Bertolini F., Man S., Rogers M. S., Cervi D., Foutz T., Rawn K., Voskas D., Dumont D. J., Ben-David Y., Lawler J., Henkin J., Huber J., Hicklin D. J., D'Amato R. J. & Kerbel R. S. 2005. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7: 101-111.

Shao E. S., Lin L., Yao Y. & Bostrom K. I. 2009. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood* 114: 2197-2206.

Shi M., Zhu J., Wang R., Chen X., Mi L., Walz T. & Springer T. A. 2011. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474: 343-349.

Shi W., Sun C., He B., Xiong W., Shi X., Yao D. & Cao X. 2004. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol* 164: 291-300.

Shi W., Chang C., Nie S., Xie S., Wan M. & Cao X. 2007. Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* 120: 1216-1224.

Shi Y., Hata A., Lo R. S., Massague J. & Pavletich N. P. 1997. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388: 87-93.

Shi Y., Wang Y. F., Jayaraman L., Yang H., Massague J. & Pavletich N. P. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94: 585-594.

Shintani M., Yagi H., Nakayama T., Saji T. & Matsuoka R. 2009. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 46: 331-337.

Short S. M., Derrien A., Narsimhan R. P., Lawler J., Ingber D. E. & Zetter B. R. 2005. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol* 168: 643-653.

Shovlin C. L., Hughes J. M., Scott J., Seidman C. E. & Seidman J. G. 1997. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 61: 68-79.

Shovlin C. L., Gutmacher A. E., Buscarini E., Faughnan M. E., Hyland R. H., Westermann C. J., Kjeldsen A. D. & Plauchu H. 2000. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91: 66-67.

Sidis Y., Mukherjee A., Keutmann H., Delbaere A., Sadatsuki M. & Schneyer A. 2006. Biological activity of follistatin isoforms and follistatin-like-3 is dependent on

differential cell surface binding and specificity for activin, myostatin, and bone morphogenetic proteins. *Endocrinology* 147: 3586-3597.

Simonneau G., Robbins I. M., Beghetti M., Channick R. N., Delcroix M., Denton C. P., Elliott C. G., Gaine S. P., Gladwin M. T., Jing Z. C., Krowka M. J., Langleben D., Nakanishi N. & Souza R. 2009. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54: S43-54.

Simons M. 2005. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111: 1556-1566.

Snyder L. & Doan C. 1944. Clinical and experimental studies in human inheritance—is the homozygous form of multiple telangiectasia lethal? *J Lab Clin Med* 29: 1211-1216.

Solloway M. J., Dudley A. T., Bikoff E. K., Lyons K. M., Hogan B. L. & Robertson E. J. 1998. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 22: 321-339.

Solloway M. J. & Robertson E. J. 1999. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126: 1753-1768.

Song J. J., Celeste A. J., Kong F. M., Jirtle R. L., Rosen V. & Thies R. S. 1995. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 136: 4293-4297.

Song K., Krause C., Shi S., Patterson M., Suto R., Grgurevic L., Vukicevic S., van Dinther M., Falb D., Ten Dijke P. & Alaoui-Ismaili M. H. 2010. Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem* 285: 12169-12180.

Song Y., Jones J. E., Beppu H., Keaney J. F., Jr., Loscalzo J. & Zhang Y. Y. 2005. Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation* 112: 553-562.

Sopory S., Nelsen S. M., Degen C., Wong C. & Christian J. L. 2006. Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J Biol Chem* 281: 34021-34031.

Sorensen L. K., Brooke B. S., Li D. Y. & Urness L. D. 2003. Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGFβ coreceptor. *Dev Biol* 261: 235-250.

Soriano P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 8: 1888-1896.

Sorrentino A., Thakur N., Grimsby S., Marcusson A., von Bulow V., Schuster N., Zhang S., Heldin C. H. & Landstrom M. 2008. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* 10: 1199-1207.

Souchelnitskiy S., Chambaz E. M. & Feige J. J. 1995. Thrombospondins selectively activate one of the two latent forms of transforming growth factor-beta present in adrenocortical cell-conditioned medium. *Endocrinology* 136: 5118-5126.

Souchelnitskiy S., Tamaki K., Engstrom U., Wernstedt C., ten Dijke P. & Heldin C. H. 1997. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 272: 28107-28115.

Souza R., Humbert M., Sztrymf B., Jais X., Yaici A., Le Pavec J., Parent F., Herve P., Soubrier F., Sitbon O. & Simonneau G. 2008. Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur Respir J* 31: 343-348.

Sporn M. B. & Todaro G. J. 1980. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303: 878-880.

- Sporn M. B., Roberts A. B., Shull J. H., Smith J. M., Ward J. M. & Sodek J.** 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing *in vivo*. *Science* 219: 1329-1331.
- Sporn M. B., Roberts A. B., Wakefield L. M. & de Crombrughe B.** 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045.
- Srinivasan S., Hanes M. A., Dickens T., Porteous M. E., Oh S. P., Hale L. P. & Marchuk D. A.** 2003. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet* 12: 473-482.
- St-Jacques S., Forte M., Lye S. J. & Letarte M.** 1994. Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* 51: 405-413.
- Stabile H., Mitola S., Moroni E., Belleri M., Nicoli S., Coltrini D., Peri F., Pessi A., Orsatti L., Talamo F., Castronovo V., Waltregny D., Cotelli F., Ribatti D. & Presta M.** 2007. Bone morphogenic protein antagonist Drm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood* 109: 1834-1840.
- Stahl A., Connor K. M., Sapieha P., Chen J., Dennison R. J., Krah N. M., Seaward M. R., Willett K. L., Aderman C. M., Guerin K. I., Hua J., Lofqvist C., Hellstrom A. & Smith L. E.** 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2813-2826.
- Star G. P., Giovinazzo M. & Langleben D.** 2010. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res* 80: 349-354.
- Staton C. A., Stribbling S. M., Tazzyman S., Hughes R., Brown N. J. & Lewis C. E.** 2004. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Experimental Pathology* 85: 233-248.
- Staton C. A., Reed M. W. & Brown N. J.** 2009. A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 90: 195-221.
- Stenvers K. L., Tursky M. L., Harder K. W., Kountouri N., Amatayakul-Chantler S., Grail D., Small C., Weinberg R. A., Sizeland A. M. & Zhu H. J.** 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23: 4371-4385.
- Sternberg C. N., Petrylak D. P., Sartor O., Witjes J. A., Demkow T., Ferrero J. M., Eymard J. C., Falcon S., Calabro F., James N., Bodrogi I., Harper P., Wirth M., Berry W., Petrone M. E., McKearn T. J., Noursalehi M., George M. & Rozenzweig M.** 2009. Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy: the SPARC trial. *J Clin Oncol* 27: 5431-5438.
- Suchting S., Freitas C., le Noble F., Benedito R., Breant C., Duarte A. & Eichmann A.** 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3225-3230.
- Suttapreyasri S., Koontongkaew S., Phongdara A. & Leggat U.** 2006. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35: 444-452.
- Suzuki C., Murakami G., Fukuchi M., Shimanuki T., Shikauchi Y., Imamura T. & Miyazono K.** 2002. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 277: 39919-39925.

Suzuki Y., Montagne K., Nishihara A., Watabe T. & Miyazono K. 2008. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem* 143: 199-206.

Suzuki Y., Ohga N., Morishita Y., Hida K., Miyazono K. & Watabe T. 2010. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 123: 1684-1692.

Szekanecz Z., Haines G. K., Harlow L. A., Shah M. R., Fong T. W., Fu R., Lin S. J., Rayan G. & Koch A. E. 1995. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol* 76: 187-194.

Sztrymf B., Coulet F., Girerd B., Yaici A., Jais X., Sitbon O., Montani D., Souza R., Simonneau G., Soubrier F. & Humbert M. 2008. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1377-1383.

Taipale J., Makinen T., Arighi E., Kukk E., Karkkainen M. & Alitalo K. 1999. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 85-96.

Tajima Y., Goto K., Yoshida M., Shinomiya K., Sekimoto T., Yoneda Y., Miyazono K. & Imamura T. 2003. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem* 278: 10716-10721.

Takahashi K., Kogaki S., Matsushita T., Nasuno S., Kurotobi S. & Ozono K. 2007. Hypoxia induces alteration of bone morphogenetic protein receptor signaling in pulmonary artery endothelial cell. *Pediatr Res* 61: 392-397.

Takahashi T., Morris E. A. & Trippel S. B. 2007. Bone morphogenetic protein-2 and -9 regulate the interaction of insulin-like growth factor-I with growth plate chondrocytes. *Int J Mol Med* 20: 53-57.

Takahashi Y., Kitadai Y., Bucana C. D., Cleary K. R. & Ellis L. M. 1995. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968.

Tamby M. C., Chanseaud Y., Humbert M., Fermanian J., Guilpain P., Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P., Brunet S., Servettaz A., Weill B., Simonneau G., Guillevin L., Boissier M. C. & Mouthon L. 2005. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 60: 765-772.

Tang Y., Katuri V., Dillner A., Mishra B., Deng C. X. & Mishra L. 2003. Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299: 574-577.

Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T. & Imaizumi T. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435.

Teicher B. A. 2011. Antiangiogenic agents and targets: A perspective. *Biochem Pharmacol* 81: 6-12.

Teichert-Kuliszewska K., Kutryk M. J., Kuliszewski M. A., Karoubi G., Courtman D. W., Zucco L., Granton J. & Stewart D. J. 2006. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98: 209-217.

ten Dijke P., Hansen P., Iwata K. K., Pieler C. & Foulkes J. G. 1988. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4715-4719.

ten Dijke P., Ichijo H., Franzen P., Schulz P., Saras J., Toyoshima H., Heldin C. H. & Miyazono K. 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8: 2879-2887.

ten Dijke P., Yamashita H., Ichijo H., Franzen P., Laiho M., Miyazono K. & Heldin C. H. 1994. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264: 101-104.

ten Dijke P. & Arthur H. M. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 857-869.

Terman B. I., Dougher-Vermazen M., Carrion M. E., Dimitrov D., Armellino D. C., Gospodarowicz D. & Bohlen P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579-1586.

Theou-Anton N., Faivre S., Dreyer C. & Raymond E. 2009. Benefit-risk assessment of sunitinib in gastrointestinal stromal tumours and renal cancer. *Drug Saf* 32: 717-734.

Thiery J. P. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15: 740-746.

Thies R. S., Chen T., Davies M. V., Tomkinson K. N., Pearson A. A., Shakey Q. A. & Wolfman N. M. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* 18: 251-259.

Thomas B., Eyries M., Montagne K., Martin S., Agrapart M., Simerman-Francois R., Letarte M. & Soubrier F. 2007. Altered endothelial gene expression associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur J Clin Invest* 37: 580-588.

Thompson T. B., Woodruff T. K. & Jardetzky T. S. 2003. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *EMBO J* 22: 1555-1566.

Thompson T. B., Lerch T. F., Cook R. W., Woodruff T. K. & Jardetzky T. S. 2005. The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* 9: 535-543.

Thomson J., Machado R., Pauciulo M., Morgan N., Yacoub M., Corris P., McNeil K., Loyd J., Nichols W. & Trembath R. 2001. Familial and sporadic primary pulmonary hypertension is caused by BMPR2 gene mutations resulting in haploinsufficiency of the bone morphogenetic protein type II receptor. *J Heart Lung Transplant* 20: 149.

Thurston G., Rudge J. S., Ioffe E., Zhou H., Ross L., Croll S. D., Glazer N., Holash J., McDonald D. M. & Yancopoulos G. D. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463.

Tian F., Zhou A. X., Smits A. M., Larsson E., Goumans M. J., Heldin C. H., Boren J. & Akyurek L. M. 2010. Endothelial cells are activated during hypoxia via endoglin/ALK-1/SMAD1/5 signaling *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 283-288.

Toporsian M., Gros R., Kabir M. G., Vera S., Govindaraju K., Eidelman D. H., Husain M. & Letarte M. 2005. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96: 684-692.

Torsney E., Charlton R., Diamond A. G., Burn J., Soames J. V. & Arthur H. M. 2003. Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation* 107: 1653-1657.

Toyono T., Nakashima M., Kuhara S. & Akamine A. 1997. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res* 76: 1555-1560.

Trembath R. C., Thomson J. R., Machado R. D., Morgan N. V., Atkinson C., Winship I., Simonneau G., Galie N., Loyd J. E., Humbert M., Nichols W. C., Morrell N. W., Berg J., Manes A., McGaughan J., Pauciulo M. & Wheeler L. 2001. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 345: 325-334.

Trindade A., Kumar S. R., Scehnet J. S., Lopes-da-Costa L., Becker J., Jiang W., Liu R., Gill P. S. & Duarte A. 2008. Overexpression of delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos. *Blood* 112: 1720-1729.

Truksa J., Peng H., Lee P. & Beutler E. 2006. Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10289-10293.

Tseng J. E., Glisson B. S., Khuri F. R., Shin D. M., Myers J. N., El-Naggar A. K., Roach J. S., Ginsberg L. E., Thall P. F., Wang X., Teddy S., Lawhorn K. N., Zentgraf R. E., Steinhaus G. D., Pluda J. M., Abbruzzese J. L., Hong W. K. & Herbst R. S. 2001. Phase II study of the antiangiogenesis agent thalidomide in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 92: 2364-2373.

Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F., Attisano L. & Wrana J. L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95: 779-791.

Tucker R. F., Branum E. L., Shipley G. D., Ryan R. J. & Moses H. L. 1984a. Specific binding to cultured cells of 125I-labeled type beta transforming growth factor from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6757-6761.

Tucker R. F., Shipley G. D., Moses H. L. & Holley R. W. 1984b. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. *Science* 226: 705-707.

Tuder R. M., Cool C. D., Geraci M. W., Wang J., Abman S. H., Wright L., Badesch D. & Voelkel N. F. 1999. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1925-1932.

Tuder R. M., Marecki J. C., Richter A., Fijalkowska I. & Flores S. 2007. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 28: 23-42, vii.

Twombly V., Bangi E., Le V., Malnic B., Singer M. A. & Wharton K. A. 2009. Functional analysis of saxophone, the Drosophila gene encoding the BMP type I receptor ortholog of human ALK1/ACVRL1 and ACVR1/ALK2. *Genetics* 183: 563-579, 561SI-568SI.

Uemura A., Kusuha S., Katsuta H. & Nishikawa S. 2006. Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Exp Cell Res* 312: 676-683.

Umans L., Cox L., Tjwa M., Bito V., Vermeire L., Laperre K., Sipido K., Moons L., Huylebroeck D. & Zwijsen A. 2007. Inactivation of Smad5 in endothelial cells and smooth muscle cells demonstrates that Smad5 is required for cardiac homeostasis. *Am J Pathol* 170: 1460-1472.

Ungefroren H., Schniewind B., Groth S., Chen W. B., Muerkoster S. S., Kalthoff H. & Fandrich F. 2007. Antitumor activity of ALK1 in pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 1641-1651.

Upton P. D., Davies R. J., Trembath R. C. & Morrell N. W. 2009. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 284: 15794-15804.

- Uriel S., Brey E. M. & Greisler H. P.** 2006. Sustained low levels of fibroblast growth factor-1 promote persistent microvascular network formation. *Am J Surg* 192: 604-609.
- Urist M. R.** 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899.
- Urness L. D., Sorensen L. K. & Li D. Y.** 2000. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* 26: 328-331.
- Valderrama-Carvajal H., Cocolakis E., Lacerte A., Lee E. H., Krystal G., Ali S. & Lebrun J. J.** 2002. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 4: 963-969.
- Valdimarsdottir G., Goumans M. J., Rosendahl A., Brugman M., Itoh S., Lebrin F., Sideras P. & ten Dijke P.** 2002. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106: 2263-2270.
- Valdimarsdottir G., Goumans M. J., Itoh F., Itoh S., Heldin C. H. & ten Dijke P.** 2006. Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol* 7: 16.
- Valera E., Isaacs M. J., Kawakami Y., Izpisua Belmonte J. C. & Choe S.** 2010. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One* 5: e11167.
- van der Zee R., Murohara T., Luo Z., Zollmann F., Passeri J., Lekutat C. & Isner J. M.** 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 95: 1030-1037.
- van Hinsbergh V. W., Engelse M. A. & Quax P. H.** 2006. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 716-728.
- van Hinsbergh V. W. & Koolwijk P.** 2008. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res* 78: 203-212.
- Varady P., Li J. Z., Cunningham M., Beres E. J., Das S., Engh J., Alden T. D., Pittman D. D., Kerns K. M., Kallmes D. F. & Helm G. A.** 2001. Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis. *Hum Gene Ther* 12: 697-710.
- Velasco S., Alvarez-Munoz P., Pericacho M., Dijke P. T., Bernabeu C., Lopez-Novoa J. M. & Rodriguez-Barbero A.** 2008. L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* 121: 913-919.
- Venkatesha S., Toporsian M., Lam C., Hanai J., Mammoto T., Kim Y. M., Bdolah Y., Lim K. H., Yuan H. T., Libermann T. A., Stillman I. E., Roberts D., D'Amore P. A., Epstein F. H., Sellke F. W., Romero R., Sukhatme V. P., Letarte M. & Karumanchi S. A.** 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12: 642-649.
- Walker E. J., Su H., Shen F., Choi E. J., Oh S. P., Chen G., Lawton M. T., Kim H., Chen Y., Chen W. & Young W. L.** 2010. Arteriovenous malformation in the adult mouse brain resembling the human disease. *Ann Neurol*.
- Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A. & Semenza G. L.** 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510-5514.
- Wang H. U., Chen Z. F. & Anderson D. J.** 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93: 741-753.
- Wang J., Sridurongrit S., Dudas M., Thomas P., Nagy A., Schneider M. D., Epstein J. A. & Kaartinen V.** 2005. Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Dev Biol* 286: 299-310.

Wang J. M., Wilson P. B., Kumar S., Pye D. & Hunter R. D. 1994. Quantitation of endothelial cell specific protein E-9 employing a single monoclonal antibody in an indirect sandwich ELISA. *J Immunol Methods* 171: 55-64.

Watanabe M., Masuyama N., Fukuda M. & Nishida E. 2000. Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* 1: 176-182.

Weber D., Kotzsch A., Nickel J., Harth S., Seher A., Mueller U., Sebald W. & Mueller T. D. 2007. A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol* 7: 6.

Weis-Garcia F. & Massague J. 1996. Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF-beta receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling. *EMBO J* 15: 276-289.

Wells R. G., Gilboa L., Sun Y., Liu X., Henis Y. I. & Lodish H. F. 1999. Transforming growth factor-beta induces formation of a dithiothreitol-resistant type I/Type II receptor complex in live cells. *J Biol Chem* 274: 5716-5722.

West J., Fagan K., Steudel W., Fouty B., Lane K., Harral J., Hoedt-Miller M., Tada Y., Ozimek J., Tudor R. & Rodman D. M. 2004. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res* 94: 1109-1114.

Westphal J. R., Willems H. W., Schalkwijk C. J., Ruiter D. J. & de Waal R. M. 1993. A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: *in vitro* and *in situ* characteristics. *J Invest Dermatol* 100: 27-34.

Wicks S. J., Lui S., Abdel-Wahab N., Mason R. M. & Chantry A. 2000. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol* 20: 8103-8111.

Wieser R., Wrana J. L. & Massague J. 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 14: 2199-2208.

Wilkes M. C., Mitchell H., Penheiter S. G., Dore J. J., Suzuki K., Edens M., Sharma D. K., Pagano R. E. & Leof E. B. 2005. Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* 65: 10431-10440.

Willette R. N., Gu J. L., Lysko P. G., Anderson K. M., Minehart H. & Yue T. 1999. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 36: 120-125.

Williams C. K., Li J. L., Murga M., Harris A. L. & Tosato G. 2006. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 107: 931-939.

Wilson C. A., di Clemente N., Ehrenfels C., Pepinsky R. B., Josso N., Vigier B. & Cate R. L. 1993. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 7: 247-257.

Winnier G., Blessing M., Labosky P. A. & Hogan B. L. 1995. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9: 2105-2116.

Wipff P. J. & Hinz B. 2008. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol* 87: 601-615.

Wong S. H., Hamel L., Chevalier S. & Philip A. 2000. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. *Eur J Biochem* 267: 5550-5560.

Wong T. S., Chan W. S., Li C. H., Liu R. W., Tang W. W., Tsao S. W., Tsang R. K., Ho W. K., Wei W. I. & Chan J. Y. 2010. Curcumin alters the migratory phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells through up-regulation of E-cadherin. *Anticancer Res* 30: 2851-2856.

Wooderchak W., Gedge F., McDonald M., Krautscheid P., Wang X., Malkiewicz J., Bukjiok C. J., Lewis T. & Bayrak-Toydemir P. 2010. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: two distinct ENG deletions in one family. *Clin Genet* 78: 484-489.

Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Mitsock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M. & Wang E. A. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.

Wrana J. L., Attisano L., Carcamo J., Zentella A., Doody J., Laiho M., Wang X. F. & Massague J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.

Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. & Massague J. 1994a. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370: 341-347.

Wrana J. L., Tran H., Attisano L., Arora K., Childs S. R., Massague J. & O'Connor M. B. 1994b. Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 14: 944-950.

Wrighton K. H., Lin X. & Feng X. H. 2009a. Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res* 19: 8-20.

Wrighton K. H., Lin X., Yu P. B. & Feng X. H. 2009b. Transforming Growth Factor {beta} Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J Biol Chem* 284: 9755-9763.

Wu G., Chen Y. G., Ozdamar B., Gyuricza C. A., Chong P. A., Wrana J. L., Massague J. & Shi Y. 2000. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287: 92-97.

Wu J. W., Hu M., Chai J., Seoane J., Huse M., Li C., Rigotti D. J., Kyin S., Muir T. W., Fairman R., Massague J. & Shi Y. 2001. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 8: 1277-1289.

Wu R. Y., Zhang Y., Feng X. H. & Derynck R. 1997. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol* 17: 2521-2528.

Wu X., Ma J., Han J. D., Wang N. & Chen Y. G. 2006. Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc Res* 71: 12-19.

Wurthner J. U., Frank D. B., Felici A., Green H. M., Cao Z., Schneider M. D., McNally J. G., Lechleider R. J. & Roberts A. B. 2001. Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *J Biol Chem* 276: 19495-19502.

Xiao Y. T., Xiang L. X. & Shao J. Z. 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 550-553.

Xiao Z., Liu X., Henis Y. I. & Lodish H. F. 2000a. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7853-7858.

Xiao Z., Liu X. & Lodish H. F. 2000b. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275: 23425-23428.

Xiao Z., Watson N., Rodriguez C. & Lodish H. F. 2001. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem* 276: 39404-39410.

Xiao Z., Brownawell A. M., Macara I. G. & Lodish H. F. 2003a. A novel nuclear export signal in Smad1 is essential for its signaling activity. *J Biol Chem* 278: 34245-34252.

Xiao Z., Latek R. & Lodish H. F. 2003b. An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* 22: 1057-1069.

Xin H., Xu X., Li L., Ning H., Rong Y., Shang Y., Wang Y., Fu X. Y. & Chang Z. 2005. CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *J Biol Chem* 280: 20842-20850.

Xu L., Chen Y. G. & Massague J. 2000. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2: 559-562.

Xu L., Kang Y., Col S. & Massague J. 2002. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* 10: 271-282.

Xu L., Alarcon C., Col S. & Massague J. 2003. Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J Biol Chem* 278: 42569-42577.

Xu X., Yin Z., Hudson J. B., Ferguson E. L. & Frasch M. 1998. Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* 12: 2354-2370.

Yagi K., Goto D., Hamamoto T., Takenoshita S., Kato M. & Miyazono K. 1999. Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem* 274: 703-709.

Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., Irie K., Oishi I., Ueno N., Taniguchi T., Nishida E. & Matsumoto K. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270: 2008-2011.

Yamakawa N., Tsuchida K. & Sugino H. 2002. The rasGAP-binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 21: 1684-1694.

Yamashita H., Ichijo H., Grimsby S., Moren A., ten Dijke P. & Miyazono K. 1994. Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269: 1995-2001.

Yamashita H., Shimizu A., Kato M., Nishitoh H., Ichijo H., Hanyu A., Morita I., Kimura M., Makishima F. & Miyazono K. 1997. Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis *in vivo*. *Exp Cell Res* 235: 218-226.

Yamashita M., Fatyol K., Jin C., Wang X., Liu Z. & Zhang Y. E. 2008. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* 31: 918-924.

Yan Z., Winawer S. & Friedman E. 1994. Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 13231-13237.

Yang X., Castilla L. H., Xu X., Li C., Gotay J., Weinstein M., Liu P. P. & Deng C. X. 1999. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development* 126: 1571-1580.

Yang X., Long L., Southwood M., Rudarakanchana N., Upton P. D., Jeffery T. K., Atkinson C., Chen H., Trembath R. C. & Morrell N. W. 2005. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 96: 1053-1063.

Yao Y., Zebboudj A. F., Shao E., Perez M. & Bostrom K. 2006. Regulation of bone morphogenetic protein-4 by matrix GLA protein in vascular endothelial cells involves activin-like kinase receptor 1. *J Biol Chem* 281: 33921-33930.

Ye L., Kynaston H. & Jiang W. G. 2008. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4. *Mol Cancer Res* 6: 1594-1606.

Ye L., Kynaston H. & Jiang W. G. 2009. Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway. *J Urol* 181: 2749-2759.

Ye L., Bokobza S., Li J., Moazzam M., Chen J., Mansel R. E. & Jiang W. G. 2010. Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Cancer Sci* 101: 2137-2144.

Yi J. Y., Shin I. & Arteaga C. L. 2005. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 280: 10870-10876.

Yoshinaga K., Obata H., Jurukovski V., Mazziere R., Chen Y., Zilberberg L., Huso D., Melamed J., Prijatelj P., Todorovic V., Dabovic B. & Rifkin D. B. 2008. Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18758-18763.

Yu J., Pan L., Qin X., Chen H., Xu Y., Chen Y. & Tang H. 2010. MTMR4 attenuates transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling by dephosphorylating R-Smads in endosomes. *J Biol Chem* 285: 8454-8462.

Yu L., Hebert M. C. & Zhang Y. E. 2002. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* 21: 3749-3759.

Yu P. B., Deng D. Y., Beppu H., Hong C. C., Lai C., Hoyng S. A., Kawai N. & Bloch K. D. 2008. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor is required for BMP-mediated growth arrest and differentiation in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* 283: 3877-3888.

Zawel L., Dai J. L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K. W., Vogelstein B. & Kern S. E. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1: 611-617.

Zhang H. & Bradley A. 1996. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122: 2977-2986.

Zhang L., Zhou H., Su Y., Sun Z., Zhang H., Zhang Y., Ning Y., Chen Y. G. & Meng A. 2004. Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors. *Science* 306: 114-117.

Zhang W., Deng Z. L., Chen L., Zuo G. W., Luo Q., Shi Q., Zhang B. Q., Wagner E. R., Rastegar F., Kim S. H., Jiang W., Shen J., Huang E., Gao Y., Gao J. L., Zhou J. Z., Luo J., Huang J., Luo X., Bi Y., Su Y., Yang K., Liu H., Lu H. H., Haydon R. C., He T. C. & He B. C. 2010. Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS One* 5: e11917.

Zhang X. L., Topley N., Ito T. & Phillips A. 2005. Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling. *J Biol Chem* 280: 12239-12245.

Zhang Y. E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19: 128-139.

Zhu H., Kavsak P., Abdollah S., Wrana J. L. & Thomsen G. H. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687-693.

Zimmerman L. B., De Jesus-Escobar J. M. & Harland R. M. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606.

Zuniga J. E., Groppe J. C., Cui Y., Hinck C. S., Contreras-Shannon V., Pakhomova O. N., Yang J., Tang Y., Mendoza V., Lopez-Casillas F., Sun L. & Hinck A.

P. 2005. Assembly of TbetaRI:TbetaRII:TGFbeta ternary complex *in vitro* with receptor extracellular domains is cooperative and isoform-dependent. J Mol Biol 354: 1052-1068.

Zurita A. J., Jonasch E., Wu H. K., Tran H. T. & Heymach J. V. 2009. Circulating biomarkers for vascular endothelial growth factor inhibitors in renal cell carcinoma. Cancer 115: 2346-2354.

Résumé

ALK1 est un récepteur de la famille du TGF- β , principalement exprimé dans les cellules endothéliales. Le ligand physiologique et circulant d'ALK1, BMP9, a été découvert par notre laboratoire en 2007, ce qui a ouvert des possibilités d'étude de la fonction d'ALK1.

La première partie de ma thèse a été consacrée à l'analyse fonctionnelle de mutants d'ALK1, retrouvés sur des patients atteints de la maladie de Rendu-Osler de type 2, en réponse à BMP9. Cette étude a permis de : 1) proposer l'haploinsuffisance fonctionnelle comme modèle de la maladie ; 2) développer un test diagnostique pour discriminer les mutations pathogènes des polymorphismes rares, basé sur leur réponse à BMP9 ; 3) d'avoir une meilleure connaissance des acides aminés d'ALK1 importants dans la réponse à BMP9.

Un second travail a consisté en la production de la forme mature de BMP9 et du domaine extracellulaire d'ALK1 en vue de l'étude de la structure cristallographique du complexe. L'expression des protéines et leur purification sont en phase d'optimisation.

Enfin, un troisième projet consistait en l'analyse du rôle de BMP9 dans l'angiogenèse *in vivo*. La neutralisation de BMP9 par deux stratégies distinctes induit une augmentation de la densité vasculaire dans la rétine de la souris. Le mécanisme est en cours d'investigation.

Abstract

ALK1 is a TGF- β family receptor, mainly expressed on endothelial cells. The physiologic and circulating ligand of ALK1, BMP9, was discovered by our laboratory in 2007, which opened opportunities for studying the function of ALK1.

The first part of my thesis was on the functional analysis of ALK1 mutants from HHT-2 patients in response to BMP9. This study allowed us to: 1) propose functional haploinsufficiency as a model for HHT-2; 2) develop a diagnostic tool to discriminate pathogenic mutations from rare polymorphisms, based on their BMP9 response; 3) increase our knowledge of important amino acids in ALK1 for the BMP9 response.

A second work was on the production of the mature form of BMP9 and of the extracellular domain of ALK1 in order to study the crystallographic structure of the complex. The expression of these proteins and their purification are in optimization phase.

Lastly, a third project was on the analysis of the role of BMP9 in angiogenesis *in vivo*. Neutralization of BMP9 using two strategies induces an increase of the vascular density of the retina in mouse. Mechanism of action is under investigation.